Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. W. Staib

Skelettmuskulatur und metabolische Homöostase:

Physiologische und pathophysiologische Aspekte der Glucocorticoidwirkung auf den Muskelstoffwechsel

Habilitationsschrift

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. med. Martin Schwenen

Düsseldorf 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0032

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. W. Staib

Skelettmuskulatur und metabolische Homöostase:

Physiologische und pathophysiologische Aspekte der Glucocorticoidwirkung auf den Muskelstoffwechsel

Habilitationsschrift

zur Erlangung der venia legendi
für das Fach Physiologische Chemie

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. med. Martin Schwenen

Düsseldorf 1981

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
1. Die Skelettmuskulatur als Glied homöostatischer Regelkreise	2
2. Allgemeine Regulationsprinzipien	3
3. Skelettmuskulatur und Glucosehomöostase des Organismus	4
- Beziehungen zwischen Aminosäurenfreisetzung aus der Muskulatur und Gluconeogenese	5
- Alanin als primäre glucoplastische Aminosäure	7
4. Die frühe Hungerphase als Untersuchungszeitpunkt	10
5. Untersuchungsobjekt und Zielsetzung der Arbeit	13
II. Methodik der Untersuchungen	14
1. Haltung und Vorbereitung der Versuchstiere für die Untersuchungen	14
Untersuchungskollektive	15
- Intakte Ratten (NORM)	15
- Adrenalektomierte Ratten (ADX)	15
- Adrenalektomiert-diabetische Ratten (ADX-DIAB)	16
- Diabetische Ratten (DIAB)	17
- Normale Ratten im Trainings- und Erschöpfungszustand	17
2. Hinterkörperpräparat und Perfusionsmethodik	20
- Hinterkörperpräparation und Stoffwechselcharakteristika des Präparates	20
- Das Perfusionssystem	23
- Das Perfusionsmedium	24
- Zeitlicher Ablauf der Hinterkörperperfusionen	28
- Perfusionskontrolle	30
3. Analytische Verfahren	36
- Metabolite im Perfusat	36
- Muskelmetabolite	38
- Analyse von Sauerstoffverbrauch, $^{14}CO_2$- und ^{14}C-Alaninbildung	39
4. Übersicht über spezielle Präparate und Applikationsverfahren	41
5. Berechnungsgrundlagen und statistische Auswertung der Ergebnisse	42

Seite

III. In-vivo-Status der Ratten zum Untersuchungszeitpunkt: Reaktion auf Änderungen der extracellulären Glucoseverfügbarkeit bei intakten und adrenalektomierten Ratten 46

1. Nahrungsabhängige Adaptationsmechanismen bei Normaltieren 46

2. Adrenalektomierte Ratten unter Basalbedingungen und nach Glucocorticoidsubstitution 53

- Homöostaseerhaltende Funktion der Glucocorticoide 55
- Wirkungen auf das Aminosäurenreservoir der Skelettmuskulatur 61
- Experimentelle Hinweise auf eine glucocorticoidabhängige Proteinmobilisation in der Skelettmuskulatur 63
- Die Muskulatur als Reservoir freier Aminosäuren 67
- Mechanismen der Glucocorticoidwirkung auf die Proteinmobilisation in der Skelettmuskulatur 68
- Hinweise auf eine Regulation des Aminosäurentransports 68
- Hinweise auf eine Regulation der Protein-Synthese 69
- Hinweise auf eine Regulation des Proteinabbaus 72
- Synopsis der Befunde: Kombinierte Synthese- und Abbauregulation von Muskelproteinen durch Glucocorticoide 76
- Gesteigerte Alaninbereitstellung aus der Skelettmuskulatur als Leitsymptom der extrahepatischen Glucocorticoidwirkung 77
- Glucocorticoid-Insulin-Interaktionen an der Skelettmuskulatur 82
- Hinweise auf "insulinantagonistische" Effekte der Glucocorticoide auf die Glucoseutilisation der Skelettmuskulatur 83
- Hinweise auf "glucocorticoidantagonistische" Effekte des Insulins auf die Aminosäurenaufnahme durch die Skelettmuskulatur 86
- Beziehungen zwischen Glucocorticoidwirkung, Insulinsekretion und Insulin-Receptor-Bindung 88
- Beziehungen der Glucocorticoide zur Glucagonsekretion 89
- Hinweise auf synergistische Wirkungen von Glucocorticoiden und Insulin 90

Zusammenfassung 90

Seite

IV. Ergebnisse und Besprechung der Untersuchungen am isoliert perfundierten Hinterkörper der Ratte 92

A. Untersuchungen an intakten und adrenalektomierten Ratten 92

1. Stoffwechselanpassung der perfundierten Muskulatur an die Situation nach Nahrungsentzug: verminderte Alanin- und Glutaminbereitstellung als Symptome des Glucocorticoidmangels 92

- Zusammenfassung 99

2. Die Wirkung einer einmaligen und mehrtägigen Betamethasonsubstitution auf den Muskelstoffwechsel der gehungerten adrenalektomierten Ratte: Steigerung der Alaninbereitstellung unter Rückgang der Glucoseutilisation 100

- Zusammenfassung 107

3. Modelluntersuchungen zum Mechanismus der Glucocorticoidwirkung auf die Alaninsynthese: Pyruvat- und aminosäurenstimulierte Alaninfreisetzung aus der Muskulatur der adrenalektomierten Ratte 109

- Hinweise auf die Steigerung der Verfügbarkeit von pyruvat- und glutamatbildenden Aminosäuren durch Glucocorticoide 110
- Einfluß einer artifiziellen Erhöhung der Verfügbarkeit von Pyruvat und verzweigtkettigen Aminosäuren auf die Alaninfreisetzung durch die Muskulatur adrenalektomierter Ratten: 115
  Effekte von Pyruvat- und Lactatzusätzen zum Perfusionsmedium, 115
  Effekte von Leucin- und Valinzusätzen zum Perfusionsmedium 119

- Zusammenfassung 124

4. Der Einfluß der Insulin- und Alaninkonzentration im Blut auf die Alaninfreisetzung durch die Muskulatur 124

- Abhängigkeit der Alaninfreisetzung von der Insulinkonzentration im Perfusat 125
- Abhängigkeit der Alaninfreisetzung von der extracellulären Alaninkonzentration 128

- Zusammenfassung 130

Seite

5. Untersuchungen zur regulativen Bedeutung des "Glucose-Alanin-Zyklus" für die Alaninfreisetzung aus der Skelettmuskulatur der hungernden intakten Ratte 131

5.1 Konzentrationsabhängige Glucoseutilisation der Muskulatur und Modulation der Alaninfreisetzung 132

5.2 Alaninfreisetzung in Situationen mit erhöhten Lactat- und Pyruvatkonzentrationen im Perfusionsmedium 135

- Physiologische Bedeutung der Pyruvat- und Lactatutilisation der Muskulatur 138
- Steigerung der Alanin- und Glutaminfreisetzung der Muskulatur während acidotischer Zustände 139

5.3 Kontraktionsabhängige Änderungen der Glucoseaufnahme, Lactatbildung und Pyruvatbereitstellung und ihre Beziehung zur Alaninfreisetzung 139

5.4 Überdauernde Glucoseaufnahmesteigerung und verminderte Alaninfreisetzung als Charakteristika von Perfusionen nach erschöpfender Muskelarbeit in vivo 146

5.5 Regulation der Alaninfreisetzung aus der Muskulatur hungernder intakter Ratten durch Erhöhung der Aminosäurenverfügbarkeit 149

Zusammenfassung 154

B. Untersuchungen an adrenalektomiert-diabetischen Ratten 155

1. Die pathophysiologische Bedeutung der Glucocorticoidwirkung auf die Alaninfreisetzung und Glucoseutilisation des Muskels für die Hyperglykämie im Insulinmangel 155

2. Das Insulin/Glucocorticoid-Verhältnis als Determinante der Alaninfreisetzung aus der Skelettmuskulatur 160

- Nachweis der Interaktion von Glucocorticoiden und Insulin bei der Alaninfreisetzung aus der Skelettmuskulatur 162

3. Entwicklung einer "Insulinresistenz" der Skelettmuskulatur nach mehrtägiger Glucocorticoidsubstitution adrenalektomiert-diabetischer Ratten 166

Zusammenfassung 170

Seite

C. Untersuchungen zum Mechanismus der Glucocorticoidwirkung auf die Muskulatur 172

1. Zeitliches Auftreten der Glucocorticoidwirkung auf die Skelettmuskulatur 173
2. Manifestation der Glucocorticoidwirkung ohne Änderung des Energiestatus der Muskulatur 174
3. Hinweise auf eine post-transcriptionelle Kontrolle der Aminosäurenverfügbarkeit des Muskels durch Glucocorticoide 176
4. Einfluß der Glucocorticoide auf den prozentualen Anteil von Glucosekohlenstoff im Alanin 178

V. Synopsis 180

VI. Literaturverzeichnis 187

VII. Danksagung 244

I. Einleitung

Die Skelettmuskulatur ist über lange Zeit unter dem funktionellen Gesichtspunkt der "machina carnis" gesehen worden; eine aktive Rolle bei der organübergreifenden, allgemeinen Stoffwechselregulation wurde ihr nicht zugesprochen.
Mit der Zunahme von Untersuchungen an menschlicher Muskulatur (63,64,69) und der gleichzeitigen Entwicklung der isolierten Hinterkörperperfusion der Ratte als ein experimentelles Modell für die Untersuchung des Muskelstoffwechsels in vitro (95-97,46) hat sich dieses Bild grundlegend geändert. Heute kann als gesichert gelten, daß die Muskulatur an der Regulation der Glucosehomöostase und Gluconeogenese entscheidenden Anteil hat; adaptive Änderungen der Glucoseutilisation und Alaninfreisetzung durch dieses Gewebe sind dabei von primärer Bedeutung (31,68,69,186).
Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Einfluß der Glucocorticoide auf beide Prozesse und den möglichen Mechanismen, die der de-novo-Alaninsynthese in der Muskulatur zugrundeliegen. Im Gegensatz zu der Vielzahl von Detailkenntnissen über Stoffwechseleffekte, subcelluläre Angriffspunkte und Hormon-Receptor-Interaktionen, kann ein befriedigendes Konzept der physiologischen Funktion dieser Hormone für die Stoffwechselregulation "von Tag zu Tag" und ihrer pathophysiologischen Bedeutung in Situationen des Insulinmangels bisher nicht vorgelegt werden. Diese Schwierigkeit ist zum Teil begründet in dem Mangel an gesicherten und quantifizierbaren Ergebnissen zur Glucocorticoidwirkung auf den Muskelstoffwechsel (46,311); sie findet nicht zuletzt ihren Ausdruck in der geringen Zahl von Übersichtsarbeiten zu dieser Thematik (268,270,370). In der kürzlich erschienenen, umfassenden Monographie "Glucocorticoid Hormone Action" (573) wird die Wissenslücke sehr deutlich.
Mit der folgenden Zusammenfassung von bisher Bekanntem und der Übersicht über meine Untersuchungen mit dem perfundierten Rattenhinterkörper möchte ich versuchen, die Stellung der

Muskulatur im Rahmen des Glucocorticoidwirkungskomplexes aufzuzeigen.

1. Die Skelettmuskulatur als Glied homöostatischer Regelkreise

Der vielfältige und ständige Wechsel von Außenbedingungen und die damit verbundene Verlagerung von Funktionsschwerpunkten innerhalb des Organismus erfordern Anpassungsmechanismen, die der Erhaltung oder Wiederherstellung vorgegebener Sollwerte dienen. Grundlage dieser auf das Ziel der metabolischen oder calorischen Homöostase ausgerichteten Prozesse sind koordinierte Stoffwechselveränderungen in den Geweben des Körpers. Umschaltungen von Deposition auf Freisetzung und von Utilisation auf Einsparung eines Substrates sind typische Merkmale der Ausgleichsvorgänge. Ihr äußeres Zeichen und zugleich eigentlicher Sinn ist die Aufrechterhaltung der extracellulären Glucosekonzentration als Grundlage der neuralen und motorischen Funktion des Organismus.

Einzelne Organe haben besonderes Gewicht in diesem Geschehen (574). Zu ihnen gehören vorrangig Leber, Fettgewebe und Muskulatur.
Die metabolische Bedeutung der Skelettmuskulatur, dem Objekt der vorliegenden Untersuchungen, ist schon aus dem hohen Anteil dieses Gewebes am Körpergewicht (40-45%) abzuleiten (1-3). Zugleich ist der Muskelstoffwechsel durch die bewegungsabhängig stark unterschiedliche Beanspruchung angelegt auf Variabilität. Der Übergang vom Ruhezustand zum Kontraktionsvorgang erfordert eine kurzfristige und erhebliche Steigerung energieliefernder Substratumsätze (4-6). Um den Energiebedarf dieses vitalen Elementarprozesses zu sichern, ist mit der Variabilität eine ausgeprägte Anpassungsfähigkeit an sich verändernde Stoffwechselbedingungen verbunden. Zu- oder Abnahme extracellulärer Substratkonzentrationen oder eine

qualitative Änderung im Muster der für die Oxidation verfügbaren Substrate sind begleitet von adaptiven Umstellungen im Intermediärstoffwechsel der Muskulatur (7-10).

2. Allgemeine Regulationsprinzipien.

Richtung und Ausmaß der metabolischen Adaptation und der sie begleitenden Substratbewegungen zwischen den Organen unterliegen der hormonellen Kontrolle. Durch Hormone wird die Reaktion des Einzelorgans in das Gesamtkonzept der Homöostaseerhaltung eingebunden. Zentralpunkte innerhalb dieses Kontrollsystems sind Pankreas und Nebennieren: die sich einstellende Stoffwechsellage wird wesentlich bestimmt durch die Polarisierung zwischen anaboler Insulinwirkung einerseits (11) und den "katabolen" Effekten von Glucagon (12), Katecholaminen (13) und Glucocorticoiden (14-16, 579) andererseits. Der hormonelle Steuervorgang selbst verläuft in der Regel nach Art eines Pendelmechanismus, indem der Rückgang der aktuell überwiegenden Komponente nicht nur von einer relativen, sondern auch absoluten Steigerung der Antagonisten gefolgt ist (Abb.1). Glucocorticoide (und wahrscheinlich auch Schilddrüsenhormone, 575-578) entscheiden dabei über die "katabole Kapazität" im Sinne einer Basaleinstellung des Systems (579, 580).

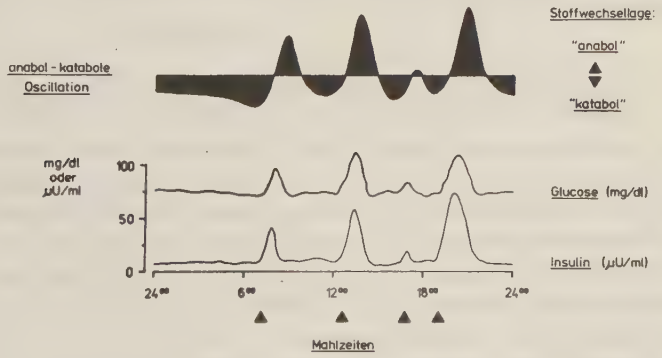


Abb.1: Physiologische Bedeutung der Oszillation zwischen kataboler und anaboler Stoffwechsellage in Abhängigkeit

von der nahrungsbedingten Zu- oder Abnahme der Insulinwirkung: die Glucosekonzentration des Blutes wird auf einen vorgegebenen Sollwert homöostatisch einreguliert (nach 17).

Eng verflochten mit dem endokrinen ist ein neuraler, über das sympathische und parasympathische Nervensystem wirkender Regelkreis. Ort der Afferenzen und Efferenzen ist der Hypothalamus, über den sich Wechselbeziehungen zur Hormonsekretion der Hypophyse ergeben. Die Wirkungen betreffen sowohl den Glykogenstoffwechsel der Leber als auch die Hormonausschüttung aus Nebennieren und Langerhans'schen Inseln (18-21).
Diesen übergeordneten, organintegrierenden Regulationsprinzipien stehen autoregulative, vom externen Substratangebot und vom Funktionszustand des Organs unmittelbar gesteuerte Mechanismen gegenüber. Als Basis einer schnellen und direkt organbezogenen Stoffwechselanpassung haben sie besondere Bedeutung für die Energiebalance der Muskulatur. Ihre Erklärung finden sie teils in der Konzentrationsabhängigkeit von Transportvorgängen und enzymkatalysierten Reaktionen, teils in der Modulation von Enzymaktivitäten durch allosterische, aktivierende oder inhibierende Effekte von Metaboliten und Einflüsse veränderter Ionenkonzentrationen (22-25). Als noch weitgehend ungeklärt sind autonome Mechanismen anzusehen, die sich am kontrahierenden Muskel auf der Ebene der Membranpermeabilität manifestieren.

3. Skelettmuskulatur und Glucosehomöostase des Organismus

Aus dem oben angesprochenen quantitativen Stellenwert der Skelettmuskulatur ergibt sich, daß bereits geringe Änderungen von Aufnahme- oder Freisetzungsraten einzelner Substrate erhebliche Rückwirkungen auf die Bilanzverhältnisse im Gesamtorganismus haben. Das Organ "Muskel" wird dadurch zu einer zentralen Größe in der positiven und negativen Beeinflussung von Stoffwechselgleichgewichten.
Ein wesentlicher Aspekt in dieser Richtung ist die Regulation

der Glucosehomöostase. An ihr ist das Muskelgewebe in mehrfacher Weise beteiligt: durch unterschiedliche Raten der Glykogensynthese, durch Erhöhung oder Verminderung der Glucoseoxidation, durch Modifikation von Reutilisationszyklen und vor allem durch Öffnung oder Schließung des in den Struktur- und Enzymproteinen vorhandenen Aminosäurenreservoirs.

Bei jedem Defizit zwischen exogener Glucosezufuhr und endogenem Verbrauch wird die Muskulatur zu einem wichtigen Glied im System der Glucoseerhaltung. Während der Abbau des Muskelglykogendepots, aufgrund des Fehlens von Glucose-6-phosphatase, praktisch ausschließlich dem Eigenstoffwechsel dient, erhalten Lactatbildung und Veränderungen des Aminosäureneffluxes allgemein-ökonomische Bedeutung. Die erhöhte Freisetzung von Gluconeogenesevorläufern bildet die Grundlage der Glucoserückgewinnung und -neugewinnung in der Leber; dadurch wird die Akutwirkung der Leberglykogenolyse ergänzt und die Kontinuität der Glucosebereitstellung auch über einen längeren Zeitraum gesichert (26-32). Zugleich wird die Glucoseutilisation des Muskelgewebes in Krisensituationen der Homöostase eingeschränkt und durch Produkte der Lipolyse substituiert (9,10,33-37).

Beziehungen zwischen Aminosäurenfreisetzung aus der Muskulatur und Gluconeogenese

Bei der mittel- und langfristigen endogenen Glucosebereitstellung durch die Gluconeogenese bilden die Skelettmuskulatur als primäre Substratquelle und die Leber als primäres Syntheseorgan eine funktionelle Einheit. Die Kooperation wird durch Hormone vermittelt (38-40). Während für die Umschaltung des Leberstoffwechsels auf erhöhte Glucoseproduktion die Verschiebung des Insulin/Glucagon-Verhältnisses im Blut bestimmend zu sein scheint (41-45), läßt sich die Fluß-

rate glucosebildender Aminosäuren von der Körperperipherie zur Leber mit Veränderungen des Insulin- und Glucocorticoideinflusses in Verbindung bringen.
Befunde früherer Untersuchungen unseres Institutes über die Wirkung von Insulin und Glucocorticoiden auf die Aminosäurenfreisetzung durch den isolierten Rattenhinterkörper stützen diese Annahme (46). Streptozotocininduzierter Diabetes erhöht, Adrenalektomie vermindert die Freisetzungsrate. Insulin- und Glucocorticoidgaben haben einander entgegengerichtete Effekte. Der Normalzustand erscheint als Resultante der Wirkung beider Hormone (Abb.2).

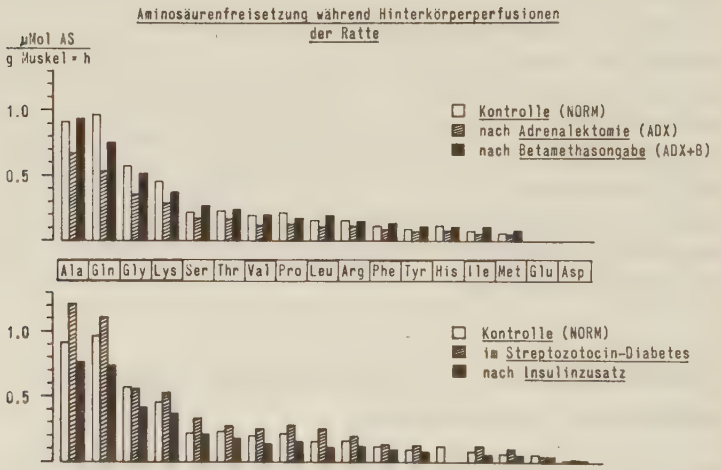


Abb.2: Aminosäurenfreisetzung aus dem isoliert perfundierten Hinterkörper normaler, streptozotocin-diabetischer und adrenalektomierter Ratten (24h-Hungerzustand). Insulinzusatz zum Perfusionsmedium vermindert, einmalige Betamethasonvorbehandlung der Tiere erhöht die Aminosäurenabgabe aus der Muskulatur (nach 46).

Unter den freigesetzten Aminosäuren stehen Alanin und Glutamin an exponierter Stelle. Ihre Quantität umfaßt etwa 50% der Gesamtfreisetzungsrate, erheblich mehr als ihrem Anteil

im Muskelprotein (6-9%) entspricht (47-51,311,78,505,581). Offensichtlich entstammt der überwiegende Teil dieser Aminosäuren einer Neusynthese im Intermediärstoffwechsel des Muskels und nicht dem Abbau außergewöhnlich alanin- oder glutaminreicher Proteine (Abb.3).

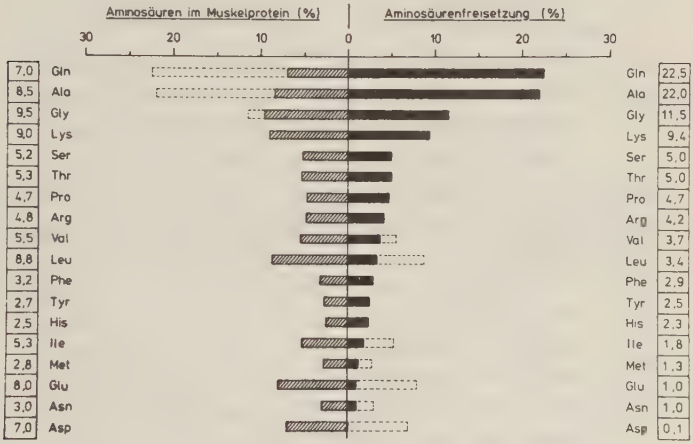


Abb.3: Gegenüberstellung der Aminosäurenfreisetzung aus dem Rattenhinterkörper (rechts) und des Aminosäurengehaltes der Muskelproteine (links). Die Meßwerte sind durch schwarze Säulen dargestellt, die Erwartungswerte durch gestrichelte Linien angedeutet (nach Daten in 46-49,311,78, 505,581 zusammengestellt).

Alanin als primäre glucoplastische Aminosäure

In gluconeogenesebetonten Situationen, beispielsweise im Hunger- oder Diabeteszustand, scheint die Alaninbildung gegenüber der Glutaminbildung bevorzugt zu sein (52,495,597,175, 525). Teleologisch handelt es sich dabei um einen sehr effektiven Anpassungsvorgang des Organismus, der sich

aus den Stoffwechselfunktionen des Alanins ableiten läßt. Darunter sind zu nennen:

1. die Substratfunktion - Alanin ist ein idealer Vorläufer für die Glucosebildung in der Leber (26,27,53) und wird von dieser bevorzugt aus dem Blut extrahiert (29,51,54,55);
2. die Regulatorfunktion - Alanin stimuliert die Glucagonsekretion (56-58) und kann als negativer Effektor der Pyruvatkinase der Leber wirken (25,59,60). Dadurch wird möglicherweise der gluconeogenetische Wirkungsgrad der Aminosäure beträchtlich verstärkt;
3. zusätzlich scheint Alanin direkt oder indirekt einen stimulierenden Einfluß auf die Leber-Glykogensynthese zu haben (61,596);
4. im Gegensatz zu Glutamin wird Alanin auch aus dem Darmgewebe freigesetzt, so daß der Nettofluß dieses Substrats zur Leber noch erhöht wird (32,54,62);
5. schließlich kann die Alaninsynthese in der Transaminasereaktion als ein Transport- und Ausscheidungsprozeß für den Stickstoff jener Aminosäuren angesehen werden, deren Kohlenstoffskelette in den Intermediärstoffwechsel des Muskels eingeschleust werden.

Entsprechend der zentralen Bedeutung dieser Aminosäure für die Lebergluconeogenese (67) und aufgrund von Ergebnissen arterio-venöser Differenzmessungen an menschlicher Muskulatur (63,64,68,69) wurde ein "Glucose-Alanin-Zyklus" zwischen Leber und Muskelgewebe postuliert (Abb.4).

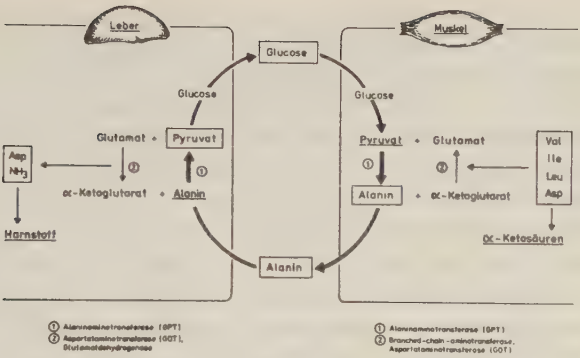


Abb.4: Konzept des "Glucose-Alanin-Zyklus" zwischen Skelettmuskulatur und Leber. Die Alaninbildung durch Aminierung glykolytisch entstehenden Pyruvats führt zur Rückgewinnung von Glucosekohlenstoff und zugleich zur Verlagerung von Aminostickstoff aus der Muskulatur in die Leber.

Durch die Verbindung von Alaninsynthese und Glykolyse in der Muskulatur könnte, analog zum "Glucose-Lactat-Zyklus" nach C.F.CORI (65-66), ein Teil des von der Muskulatur aufgenommenen Glucosekohlenstoffs in der Leber-Gluconeogenese zurückgewonnen und erneut zur Disposition gestellt werden. Als Hinweis auf die Existenz und regulative Bedeutung des "Glucose-Alanin-Zyklus" wurde die bei in-vivo-Untersuchungen am Menschen festgestellte Korrelation der Alaninfreisetzung mit unterschiedlichen Raten der Glucoseutilisation und Pyruvatbereitstellung durch die Muskulatur gewertet (64). Da Insulin die Glucosebildung aus Alanin in der Leber hemmt (70-73), erhielte der Zyklus besonderes Gewicht in Situationen des Insulindefizits, wie Nahrungsentzug, längere Arbeitsbelastung oder Diabetes mellitus. Ein gleichzeitiges Übergewicht von Glucocorticoiden (72,76) und Glucagon (67,74,75) würde die Effektivität des Zyklus auf hepatischer Ebene erhöhen.

Eine de-novo-Synthese von Alanin wurde in Untersuchungen der letzten Jahre an verschiedenen Muskelpräparaten nachgewiesen (47,77-83,311,490-493,497). Die Interpretation der Befunde und die Diskussion um den Syntheseweg ist jedoch uneinheitlich: während die quantitative Modulation der Alaninbildung und -freisetzung einerseits mit Unterschieden in der aktuellen Verfügbarkeit glykolytisch entstehenden Pyruvats im Sinne des "Glucose-Alanin-Zyklus" erklärt wird (47,78,471,492,496), kommt nach anderen Autoren der erhöhten Einschleusung bestimmter Aminosäuren in den Intermediärstoffwechsel der Muskulatur eine primäre Bedeutung für die Alaninsynthese zu. Dabei soll eine Transformation von Aminosäurengerüsten zu Pyruvat erfolgen, das als Aminogruppen-Akzeptor dient (80,82,83,469,470 490). In diesem Falle würde die Alaningluconeogenese nicht zur Reutilisation, sondern zur Neusynthese von Glucose aus proteinogenem Kohlenstoff führen.
Eine Zuordnung der in-vitro-Befunde zu den am Menschen gemachten Beobachtungen und eine Aussage über die physiologische Regulation der Alaninfreisetzung aus der Muskulatur ist bisher nur sehr begrenzt möglich. Das betrifft sowohl das Problem der Abhängigkeit der Alaninbildung von nichthormonellen Änderungen des Glucose- und Pyruvatstoffwechsels als auch die weitgehend offene Frage der hormonellen Regulation der Freisetzungsrate (47,52,584,585).
Die bisher bekannten Wirkungen von Glucocorticoiden und Insulin auf die muskuläre Aminosäuren-Freisetzung (siehe Abb.2) und den Leberstoffwechsel lassen vermuten, daß beide Hormone an der Koordination von Alaninfreisetzung und Gluconeogenese-rate beteiligt sind.

4. Die frühe Hungerphase als Untersuchungszeitpunkt

Unter den physiologischen Situationen des erhöhten Alaninbedarfes ist der frühe Hungerzustand besonders charakteristisch (31). Er löst die insulinbetonte absorptive Phase

mit Kohlenhydratdeposition, Proteinsynthese und Lipogenese ab; der vorübergehend glucohomöostatisch wirkende Abbau des Leberglykogens ist zu diesem Zeitpunkt beendet. Die hormonellen Merkmale des Adaptationsvorganges an den Nahrungsentzug sind die abnehmende Insulinwirkung, die reziprok zunehmende Glucagonwirkung (Abb.5) und das relative Übergewicht von Glucocorticoiden, das bei Entwicklung einer Hypoglykämie auch quantitativ deutlich wird (85,582).

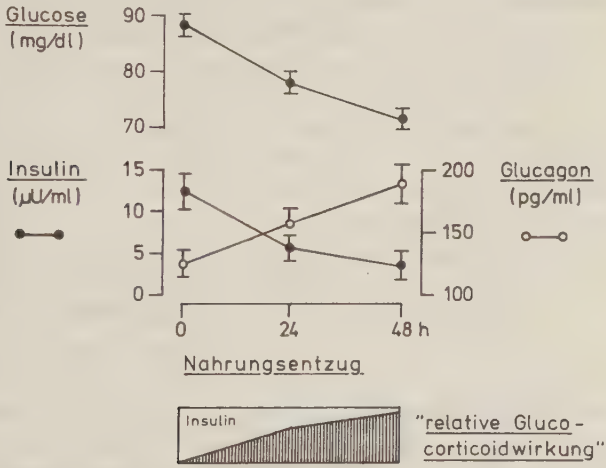


Abb.5: Hormonelle Prägung der frühen Hungerphase: Abnahme der Insulin- und reziproke Zunahme der Glucagonkonzentration (nach 84).
Unter Rückgang der Insulinwirkung kommt es zu einem relativen Übergewicht der Glucocorticoide. Ein 2-3 facher Anstieg der Corticosteronkonzentration wurde nach mehrtägigem Nahrungsentzug bei Ratten beobachtet (583).

Der Glucoseverbrauch durch Gehirn und andere Gewebe ist in dieser Situation noch wenig reduziert, der Gluconeogenesebedarf entsprechend hoch. Neben der Lactatbildung ist die Aminosäurenabgabe aus dem Depot der Muskulatur, darunter an erster Stelle die Alaninfreisetzung, entscheidend für

die Aufrechterhaltung der Blutglucosekonzentration (32,68). Ihre Bedeutung geht zurück bei anhaltendem Nahrungsentzug und zunehmendem Ersatz der Glucose durch Fettsäuren und Ketonkörper (Abb.6). Der Energiestoffwechsel des zentralen Nervensystems wird auf Ketonkörperutilisation eingestellt (87).

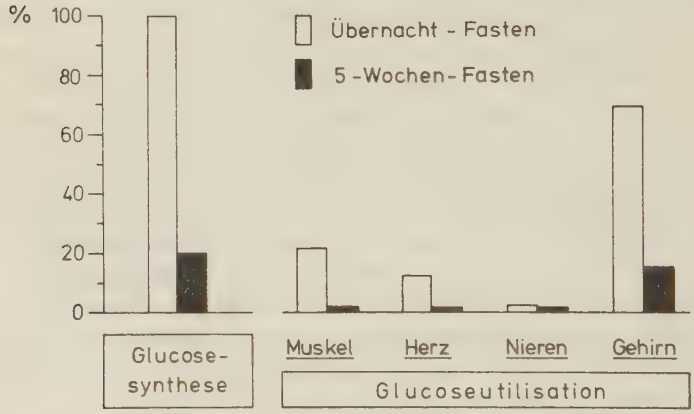


Abb.6: Rückgang der Glucoseutilisation und des Gluconeogenesebedarfs bei anhaltendem Nahrungsentzug (nach 86). Alaninfreisetzung aus der Muskulatur und fraktionelle Extraktion durch die Leber korrelieren mit dem verminderten Glucosebedarf (29).

Die zunächst hormonelle Steuerung der Substratutilisation und -liberation scheint jetzt überlagert zu werden durch regulatorische Effekte dieser Metabolite, vor allem der Ketonkörper (8,31,36,88,89); damit wird den letalen Folgen eines ungehindert fortschreitenden Abbaus von Struktur- und Enzymproteinen rechtzeitig vorgebeugt und dem Organismus die Anpassung an extreme Notsituationen, wie einem mehrwöchigen totalen Nahrungsentzug, ermöglicht.

5. Untersuchungsobjekt und Zielsetzung der Arbeit

Für die Untersuchungen wurde die Methode der Hinterkörperperfusion der Ratte gewählt. Der Stoffwechsel des isolierten Hinterkörpers wird bestimmt von der Skelettmuskulatur. Die intakte Organeinheit kann zugleich als repräsentativ für den Gesamtorganismus angesehen werden, da sie etwa 40% der Muskelmasse des Tierkörpers enthält. Herausgelöst aus den Wechselbeziehungen zu anderen Organen und dem komplexen hormonellen Milieu in vivo, erlaubt das in-vitro-Präparat die eigenständige Beurteilung sowohl der Wirkung einzelner Hormone als auch substrat- und kontraktionsabhängiger Regulationsvorgänge im Muskelgewebe.

Ziel der an diesem Präparat durchgeführten Experimente ist die Abklärung der bisher umstrittenen physiologischen Relevanz von Glucocorticoidwirkungen auf den Aminosäuren- und Glucosestoffwechsel der Skelettmuskulatur und ihrer Beziehung zur Symptomatik des Diabetes mellitus. Die Schwerpunkte der Untersuchungen, die an intakten, adrenalektomierten, adrenalektomiert-diabetischen und diabetischen Ratten durchgeführt werden, liegen dabei auf folgenden offenen Fragen:

a) Welche Bedeutung haben Glucocorticoide für die normale Alaninbereitstellung aus der Muskulatur? Kann die nahrungsabhängig unterschiedliche Freisetzungsrate dieser für die Glucosehomöostase essentiellen Aminosäure auf die Interaktion von Glucocorticoiden und Insulin zurückgeführt werden?
b) Welcher Mechanismus liegt der Zunahme der de-novo-Alaninsynthese in Gluconeogenesesituationen zugrunde? Steht die Rückgewinnung von Glucosekohlenstoff im Sinne des "Glucose-Alanin-Zyklus" im Vordergrund oder ist die Synthese primär von der erhöhten Verfügbarkeit und dem Umsatz bestimmter, in den Intermediärstoffwechsel des Muskels einmündender Aminosäuren abhängig?
c) Welche Wirkung haben Glucocorticoide auf die Glucoseutilisation der Muskulatur? Ergeben sich Hinweise auf die häufig diskutierte, bisher jedoch nie eindeutig nachgewiese-

ne Hemmung von Glucosetransport und -oxidation in diesem Gewebe?

d) Welcher pathophysiologische Stellenwert kommt muskulären Glucocorticoideffekten bei der Manifestation der diabetischen Hyperglykämie zu? Werden die verminderte Glucoseaufnahme und gesteigerte Alaninfreisetzung der Muskulatur im Insulinmangel durch "insulinantagonistische" Wirkungen der Nebennierenrindenhormone vermittelt?

Die Fragestellungen und Untersuchungskonzepte sind in engem Zusammenhang mit Befunden zu sehen, die bisher an lebenden Ratten oder speziellen in-vitro-Präparaten erhoben wurden. Der Darstellung der Ergebnisse der isolierten Hinterkörperperfusionen ist daher eine Beschreibung der am Ganztier zu beobachtenden, nahrungsabhängigen Anpassungsvorgänge und eine Übersicht über die bereits bekannten oder vermuteten Glucocorticoidwirkungen auf die Skelettmuskulatur vorangestellt.

II. Methodik der Untersuchungen

1. Haltung und Vorbereitung der Versuchstiere für die Untersuchungen

Für die Untersuchungen wurden 11-13 Wochen alte männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 170 und 240 g verwendet. Die Aufzucht erfolgte in klimatisierten Räumen der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden. Als Futter diente eine Standarddiät für Ratten (Altromin 1314; Altromin GmbH, Lage) mit etwa 43% Kohlenhydraten, 22.5% Rohprotein (zusätzlich Methionin und Lysin) und 5.5% Rohfett.

In Untersuchungen des frühen Hungerzustandes wurde den Tieren die Nahrung 24 Stunden vor Beginn der Versuche entzogen bei weiterer Trinkwasserzufuhr ad libitum. Die Ratten befinden sich nach diesem Zeitraum in einer für die Reproduzierbarkeit der Untersuchungen günstigen, ausgeglichenen Stoffwechsellage. Der Adaptationszustand, der in der Einleitung als "frühe Hungerphase" definiert wurde, ist voll ausgeprägt (Abb.7).

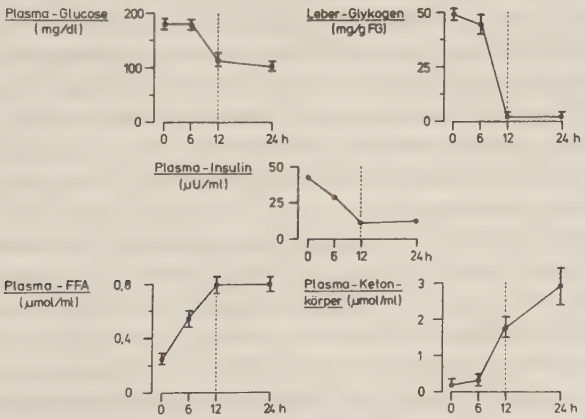


Abb.7: Zeitlicher Ablauf der Anpassung normaler Ratten an den Hungerzustand (nach 90). Zwischen der

12. und 24. Stunde nach Nahrungsentzug werden die Anpassungsmechanismen wirksam, die zur Erhaltung der Blutglucosekonzentration führen.
Die glucoseabhängige Sekretionsschwelle für Insulin wird für Ratten mit 110 mg/dl angegeben (91).

Untersuchungskollektive

a) Intakte Ratten (NORM):
Normale Käfighaltung bis zum Beginn der Versuche

b) Adrenalektomierte Ratten (ADX):
Für die Untersuchung von Glucocorticoidwirkungen auf den Stoffwechsel der Hinterkörpermuskulatur wurden Ratten im Hormonmangelzustand verwendet. Die totale bilaterale Adrenalektomie wurde in der Regel 6 Tage vor den Versuchen durchgeführt. Die Excision der Nebennieren erfolgte unter Hexobarbital-Narkose (15 mg/100 g KG i.p.) nach dorsaler Öffnung der Bauchhöhle und Unterbindung des zugehörigen Gefäßstranges. Postoperativ wurden die Ratten in gleicher Weise gehalten wie die Normaltiere; das Trinkwasser enthielt jedoch 9 g NaCl/l zur Substitution des Natriumverlustes.
Akute Glucocorticoideffekte (ADX + B) wurden nach einmaliger in-vivo-Injektion des synthetischen Steroids Betamethason (500 µg/100 g KG i.p.) untersucht (Abb.8). Der Zeitabstand zur Perfusion betrug, außer in Versuchen zur Abklärung des Eintritts der Glucocorticoidwirkung, 3 - 4 Stunden. Aus den später gezeigten in-vivo-Befunden ist abzuleiten, daß nach dieser Zeit eine volle Ausprägung der Hormonwirkung besteht.
Langfristige Glucocorticoideffekte (ADX + BL) wurden nach fünftägiger Substitution mit Betamethason (2 x 100 µg/100 g KG s.c. pro Tag) untersucht. Beginnend mit dem Tag nach Adrenalektomie, erfolgten die Injektionen täglich gegen 8 und 18 Uhr. Am Perfusionstag wurde als einmalige Morgendosis 500 µg/100 g KG i.p. verabreicht. Das Kontrollkollektiv (ADX-L) erhielt tägliche Injektionen von 2 x 0.1 ml physiologischer Kochsalzlösung.

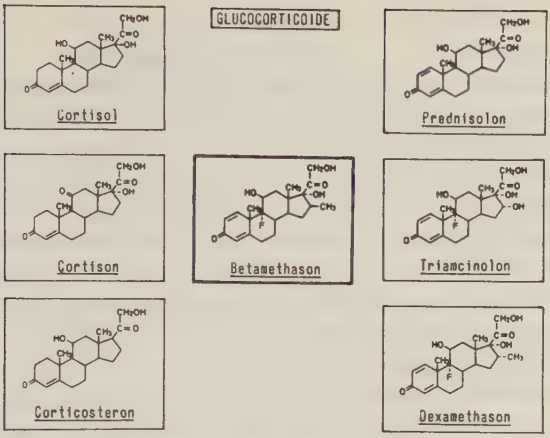


Abb.8: Die Gruppe der Glucocorticoide.
Natürliches Glucocorticoid der Ratte ist Corticosteron (92). Das verwendete Prednisolonderivat Betamethason (9 α-Fluor-16 ß-methyl-prednisolon) ist, bezogen auf die glucogene Potenz, 1o - 2o-fach stärker wirksam als die natürlichen Glucocorticoide (14, 93).

c) Adrenalektomiert-diabetische Ratten (ADX-DIAB):
Die Diabeteserzeugung erfolgte zusammen mit der Adrenalektomie durch Injektion von Streptozotocinlösung (1o mg/1oo g KG) in den Oberbauchbereich. Zur Kontrolle des eingetretenen Diabetes wurde die Blutglucosekonzentration im Schwanzvenenblut der Ratten reflektometrisch (EYETONE^{R}-Reflektometer, Miles GmbH, Sparte Ames, Frankfurt) in regelmäßigen Abständen überprüft. Auf den Verlauf des Diabetes wird im Zusammenhang mit der Ergebnisbeschreibung eingegangen. Für die Versuche wurden nur Tiere verwendet, deren Blutglucosekonzentration im Futterzustand 3oo mg/dl überschritt.
Akute Glucocorticoideffekte (ADX-DIAB+B) wurden in Analogie zu den adrenalektomierten Tieren nach einmaliger Injektion von Betamethason (5oo µg/1oo KG i.p.) untersucht.
Langfristige Glucocorticoideffekte (ADX-DIAB+BL) wurden nach dreitägiger Substitution mit Betamethason (5o µg/1oo g KG morgens und 1oo µg/1oo g KG abends s.c.) untersucht. Die

Injektionen begannen am 3. Tag nach Adrenalektomie und Diabeteserzeugung.

Langfristige Insulineffekte (ADX-DIAB+IL) wurden nach 4.5-tägiger Substitution mit einem mehrphasisch wirksamen Depotinsulin (MONOTARD^{R}, Novo Industrie GmbH, Pharmaceutika, Mainz) untersucht. Die Injektionen (durchschnittlich 1.5 IE/1oo g KG morgens und 2 IE/1oog KG abends) begannen am Abend des 1. Tages nach Adrenalektomie und Diabeteserzeugung. Unter diesem Applikationsschema wurde die Blutglucosekonzentration innerhalb von 3 Stunden auf 5o-1oo mg/dl gesenkt; nach 12 Stunden (vor der jeweils nächsten Applikation) lag sie bei 15o-2oo mg/dl.

Kombinierte Betamethason- und Insulinsubstitution (ADX-DIAB+BL+IL) erfolgte durch gleichzeitige Injektion beider Hormone nach dem angegebenen Zeit- und Applikationsschema. Unter gleichzeitiger Betamethasonsubstitution war die Blutglucosekonzentration sehr schwer zu korrigieren. 12 h nach Insulingabe betrug sie 3oo-4oo mg/dl (Abb.9).

d) Diabetische Ratten (DIAB):

Da diese Tiere mit adrenalektomiert-diabetischen Ratten verglichen wurden, erfolgte die Diabeteserzeugung nach dorsaler Eröffnung der Bauchhöhle (Operationsverfahren wie bei der Adrenalektomie) durch Injektion von Streptozotocin-Lösung (1o mg/1oo g KG) in den Oberbauchbereich. Im Futterzustand betrug die Blutglucosekonzentration in der Schwanzvene der diabetischen Tiere 35o-4oo mg/dl; im Hungerzustand sank sie auf Werte um 25o mg/dl ab. Die genauen Daten werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen dargestellt. Eine Ketonurie entwickelte sich bei diesen Tieren nicht.

e) Normale Ratten im Trainings- und Erschöpfungszustand:

Die Untersuchung von Trainingseffekten auf den Muskelstoffwechsel erfolgte nach einer sechswöchigen intensiven Laufbelastung mit den Charakteristika eines dynamischen, allgemeinen Ausdauertrainings (94). Das Training wurde auf einem

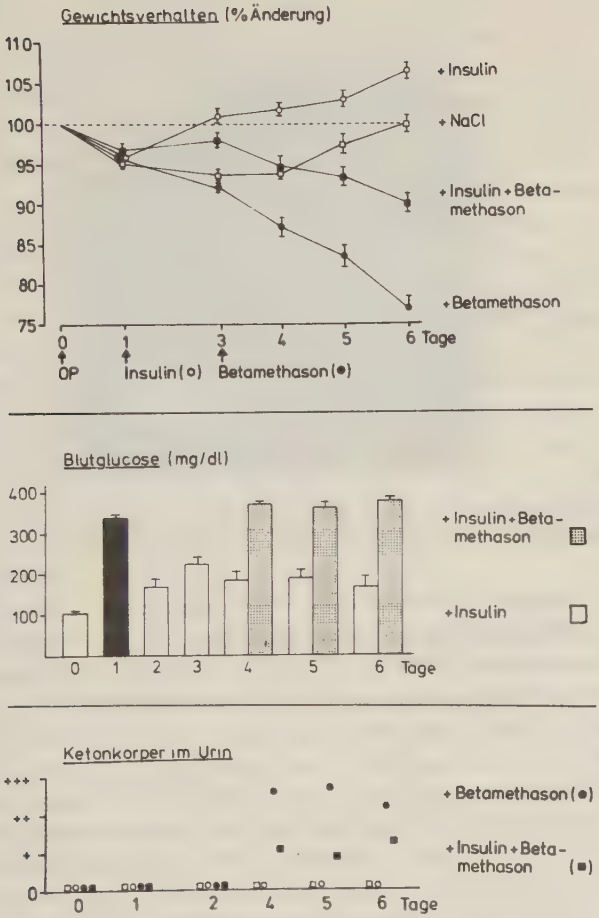


Abb.9: Gewichtsverhalten, Blutglucosekonzentration in der Schwanzvene und Ketonurie adrenalektomiert-diabetischer Ratten unter Substitution mit Glucocorticoiden und Insulin. Mittelwerte und s_{EM} (n = 8-23).

selbstentworfenen Laufband mit Boxen von 1 m Länge und einer Steigung von 8^{o} durchgeführt (Abb.1o).

Abb.1o: Laufband mit stufenlos regelbarer Geschwindigkeit (2-44 m/min) für Trainingsuntersuchungen an Ratten.

Das Trainingsprogramm (zwei Stunden täglich an 5 Tagen der Woche) begann mit einer Laufleistung von 1o - 15 m/min in der ersten Woche und wurde schrittweise auf 3o - 35 m/min in der letzten Woche gesteigert. Als Kontrollen dienten alters- und gewichtsmäßig vergleichbare Tiere aus normaler Käfighaltung.

Akute Erschöpfungszustände untrainierter und trainierter Normaltiere wurden durch Lauf bis zur totalen Erschöpfung mit direkt anschließender intraoperativer Elektrostimulation der gewichtsbelasteten Hinterbeine herbeigeführt. Die Ermüdung der untrainierten Ratten auf dem Laufband trat dabei erheblich rascher (etwa 5 gegenüber 2o Minuten) und bei weitaus geringerer Belastungsintensität (Laufleistung von etwa 15 m/min gegenüber 35 m/min) als bei den trainierten Vergleichstieren ein.

2. Hinterkörperpräparat und Perfusionsmethodik

Der isoliert perfundierte Rattenhinterkörper hat sich seit einigen Jahren als Organmodell für die Untersuchung des Muskelstoffwechsels in vitro bewährt (95-98). Metabolische Parameter des in-vitro-Präparates sind, wie eigene Untersuchungen und Ergebnisse anderer Autoren (46, 81, 95, 99, 1oo) zeigten, über zwei bis drei Stunden reproduzierbar darzustellen; die biochemische Validität bleibt innerhalb dieses Zeitraumes erhalten. Als ein gewisser Nachteil des Präparates kann die nicht absolut homogene Gewebezusammensetzung angesehen werden; neben Muskulatur verschiedener Fasertypen (1o1-1o3) enthält es in geringem Umfang andere Gewebearten (Tab.1). Diesem Nachteil steht jedoch der Vorteil einer strukturell und funktionell intakten Organeinheit gegenüber. Im Vergleich zu durchströmten Einzelmuskeln (1o4-1o7), Muskelinkubaten (1o8) oder Herzperfusionen (98) wird eine repräsentative und physiologisch relevante Muskelmasse des Körpers (etwa 4o %) untersucht - ein Aspekt, der besonders für die quantitative Beurteilung von Adaptationsvorgängen wichtig ist.

Hinterkörperpräparation und Stoffwechselcharakteristika des Präparates

Die Präparation des Hinterkörpers, deren Einzelschritte im wesentlichen mit der Methodik anderer Autoren (95, 586, 97, 98, 444) übereinstimmt, umfaßt die Evisceration der Becken- und Bauchorgane (außer Leber und Nieren) und verschiedene Gefäßligaturen, die der Eingrenzung des zu perfundierenden Körperabschnittes dienen. In Aorta und V. cava inf. werden Kanülen genormten Durchmessers vorgeschoben und fixiert. Vor Anschluß an das Rezirkulationssystem wird der Hinterkörper mit 5o-7o ml Perfusionsmedium durchspült, um das noch vorhandene Tierblut zu entfernen. Während dieser "Vorperfusion" wird der Rumpf der durch Thorakotomie getöteten Ratte in Höhe der unteren Nierenpole durch eine

Gewebezusammensetzung und errechnete oxidative Stoffwechselaktivität des Rattenhinterkörpers

	Feuchtgewicht g	Feuchtgewicht %	Trockengewicht mg	Q_{O_2} µl O_2 / mg TG · 60min	µl O_2 / min	O_2-Verbrauch µMol O_2 / min	%-Anteile
HINTERKÖRPER	43	100				15,13	100
SKELETTMUSKEL	30	70	25% von 30 g 7500	~ 2,4	300	13,40	88,6
FETTGEWEBE (ohne Speicherfett: ~1g)	1,7	4	15% von 1g 150	~ 0,5	1,3	0,06	0,4
HAUT (und Subcutanfettgewebe)	6	14	35% von 6g 2100	~ 0,5	17,5	0,78	5,1
KNOCHEN (Knochenmark: ~ 0,5 g)	5,3	12	65% von 0,5g 325	~ 3,7	20,0	0,89	5,9

Muskelfasertypen des Rattenhinterkörpers	~ 50% "fast-twitch" oxidativ glykolytisch (FOG)
	~ 45% "fast-twitch" glykolytisch (FG)
	~ 5% "slow-twitch" oxidativ (SO)

Tab.1: Gewebezusammensetzung und oxidative Stoffwechselaktivität des isolierten Hinterkörpers einer 180 g schweren Ratte. Die Tabelle basiert auf eigenen Messungen und einer Zusammenstellung von Literaturdaten (109-112; Analyse der Muskelfasertypen nach 101).
Die aus den Oxidationsquotienten Q_{O_2} (Sauerstoffverbrauch der Gewebe, bezogen auf deren Trockengewicht TG) theoretisch errechnete Sauerstoffaufnahme des Präparates stimmt mit dem in vitro und in vivo ermittelten Normalbereich von 14 - 16 µmol/30 g Muskulatur x min (Werte für den ruhenden Muskel) weitgehend überein.

am Operationstisch befestigte kleine Stahlstange komprimiert; der Hinterkörper wird dadurch von allen vasalen und neuralen Verbindungen zum Oberkörper isoliert. Ein Verlust von Perfusionsmedium in obere Körperabschnitte hinein ist dadurch ausgeschlossen.
Der durchströmte Bereich des Präparates erstreckt sich von der Aortenbifurkation abwärts und schließt die Gewebe des Beckens und der Hinterbeine ein (Abb.11).

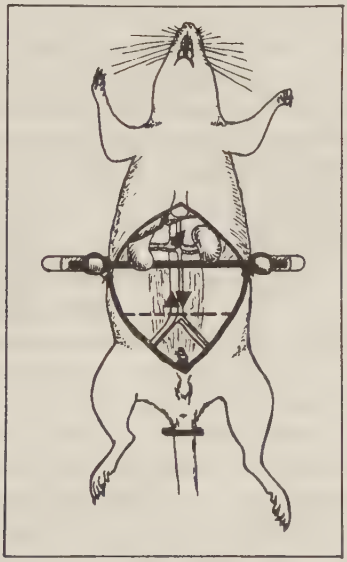


Abb.11: Durchströmter Körperabschnitt bei Hinterkörperperfusionen der Ratte. Die obere Perfusionsgrenze liegt in Höhe der Bifurkation der großen Gefäße und ist gestrichelt dargestellt. Die Lage der Kanülenspitzen ist durch Dreiecksymbole angedeutet. Durch Kompression des Rumpfes unterhalb der Nieren werden alle Verbindungen zum übrigen Körper aufgehoben.

Zusammensetzung und oxidative Stoffwechselaktivität des perfundierten Hinterkörperbereiches lassen die absolute Dominanz des Muskelgewebes erkennen (siehe Tab.1). Mit

nur geringer Einschränkung kann daher von einem "Skelettmuskelpräparat" gesprochen werden.
Aufgrund dieser Verhältnisse wurde als Bezugsgröße bei der Bilanzierung von Substratveränderungen während der Perfusion der Muskelanteil des Präparates gewählt. Seine Relation zum Körpergewicht der verwendeten Tiere ist mit durchschnittlich 1 : 6 weitgehend konstant (113, 95): bei einer 18o g schweren, 24-Stunden gehungerten Ratte werden 3o g Muskulatur perfundiert.
Die genaue Relation wurde in den einzelnen Versuchsreihen durch Gewichtsanalyse der Bestandteile des perfundierten Hinterkörpers ermittelt; eine größere Abweichung von dem angegebenen Wert fand sich nur bei gefütterten Tieren (3o g Muskulatur bei einem Körpergewicht von 2oo-21o g).

Das Perfusionssystem

Die Perfusionen erfolgten in einem Kreislaufsystem, dessen Hauptelemente in einer auf 37 °C thermostatisierten Kammer untergebracht sind (Abb.12). Zentrales Reservoir ist ein Scheibenoxygenator (114), von dem aus das sauerstoffgesättigte Perfusionsmedium über eine pH-pO_2-Meßkette (Radiometer, Kopenhagen) in ein zweites kleines, dem Präparat vorgeschaltetes Blutreservoir gepumpt wird, das durch einen Überlauf mit dem Oxygenator verbunden ist. Aus diesem Gefäß strömt das Medium mit konstantem hydrostatischen Druck von 8o mm Hg in das Organ ein; nach seiner Passage kehrt es über einen Durchflußmesser zum Oxygenator zurück. In die Abflußleitung kann zusätzlich eine Schleife zur pH-pO_2-Meßkette gelegt werden, die venöse Messungen ermöglicht.

Zur Begasung des Systems wird Carbogen (95 % O_2/5 % CO_2) verwendet, das nach Anfeuchtung und Passage eines Manometers und Wasserabscheiders in den Oxygenator eintritt, aus dem es unter geringem Unterdruck über CO_2-Absorptionsgefäße abgesaugt wird.

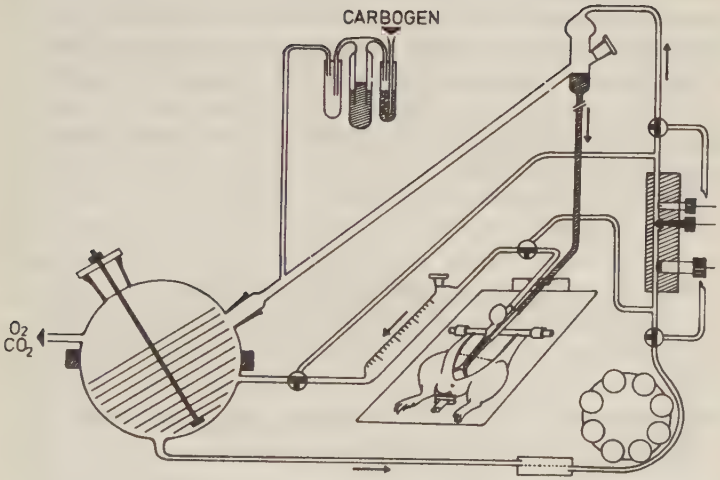


Abb.12: Schematische Darstellung des Perfusionssystems für Rattenhinterkörper.
Die Flußrichtung des Perfusats ist durch Pfeile gekennzeichnet. Mediumproben zur Analyse werden aus dem kleinen Überlaufreservoir entnommen. Weitere Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen.

Das Perfusionsmedium

Als Blutersatz für die Organperfusion wurde ein halbsynthetisches Medium gewählt, das sich aufgrund seiner Fließeigenschaften und Sauerstoffbereitstellung bei Leberperfusionen bewährt hat (115-118). Es kommt den Charakteristika des natürlichen Blutes sehr nahe, ist jedoch in seiner Zusammensetzung kontrollier- und reproduzierbar.

Osmotisch wirksame Basis des Perfusionsmediums ist ein KREBS-RINGER-Bicarbonat-Puffer (119), dem als onkotisch wirksamer Anteil Rinderserumalbumin (4 g/dl) und als Sauerstoffträger ein bis zwei Tage alte, mehrfach gewaschene Rindererythrocyten (1o g Hb/dl) zugesetzt werden. Die Glucosekonzentration des "Standardmediums" beträgt 11 mmol/l. Als Folge der Äquilibrierung mit Erythrocytenmetaboliten enthält das Perfusat primär etwa 0.7 - 1.5 µmol/ml Lactat. Zum Angleich des Lactat/Pyruvat-Verhältnisses an in-vivo-Bedingungen wurde daher dem Medium 0.15o µmol/ml Pyruvat zugesetzt (Tab.2)

SEMI-SYNTHETISCHER BLUTERSATZ FUR ORGANPERFUSIONEN

Bestandteile	Konzentrationen	Präparate und Art der Vorbereitung
KREBS-RINGER-Bicarbonat-Puffer, pH ~7.38 (KRB-Puffer)	mVal/l K^+ 5.94 Na^+ 143.52 Ca^{++} 5.08 Mg^{++} 2.10 Cl^- 130.70 $H_2PO_4^-$ 1.19 HCO_3^- 24.76	15-minütige Begasung mit CARBOGEN (95% O_2 / 5% CO_2)
Rindererythrocyten als Hamoglobinträger	10 g/100 ml Hb Hämatokrit ~28 %	1 - 2 Tage alte Rindererythrocyten: zweimal mit 0.9%iger NaCl-Lösung, zweimal mit KRB-Puffer gewaschen
Rinderserum-Albumin	4 g/100 ml	COHN Fraction V - PENTEX/MILES: in KRB-Puffer gelöst - zweimal 24 Std. gegen KRB-Puffer dialysiert
Heparin	5000 USPE/100 ml	LIQUEMIN 5000 - HOFFMANN-LA ROCHE
D-(+)-Glucose	11 mM	∝-D-Glucose p.A. - SERVA 22700
Pyruvat-Na	0.15 mM	MERCK 6619
L-(+)-Lactat	0.7 - 1.5 mM	aus den Erythrocyten

Tab.2: Zusammensetzung des halbsynthetischen Blutersatzes für Hinterkörperperfusionen der Ratte.
Der endgültige pH-Wert des Mediums wird im Rezirkulationssystem durch Zusatz von $NaHCO_3$ auf 7.35 - 7.42 eingestellt.

Außer den angegebenen Substraten hat das Medium primär einen geringen Gehalt an freien Aminosäuren (etwa 0.o6o - 0.o7o µmol/ml, davon etwa 3o - 5o % Alanin) und unveresterten Fettsäuren (etwa 0.2oo µmol/ml).
In Perfusionen zur Untersuchung von Substrateinflüssen auf den Muskelstoffwechsel wurden die Substratkonzentrationen (Glucose, Lactat, Pyruvat, Aminosäuren) entsprechend den jeweils angegebenen Versuchsbedingungen abgeändert.

Durch die Verwendung frischer Rindererythrocyten als Sauerstoffträger des Perfusionsmediums ergibt sich ein Unterschied zur Methodik der meisten anderen Arbeitsgruppen (95, 96, 474), die gealterte Humanerythrocyten einsetzen. Alte Erythrocyten haben den Vorteil einer praktisch aufgehobenen Glykolyserate, dagegen den Nachteil einer verringerten mechanischen und osmotischen Resistenz und möglicherweise einer verzögerten Sauerstoff-Freisetzung während der Gewebspassage (12o-123). Die unterschiedliche Hämolyseanfälligkeit der beiden Erythrocytenarten zeigten eigene Vergleichsuntersuchungen sehr deutlich (Tab.3).

Glucose (µmol/ml)	Erythrocyten-art	Lactat (µmol/ml)	Hämolyse (g Hb/dl) 0 min	60 min	Durchfluß (ml/30g×min)
5.5	Human (2)	3.16	0.204	0.308	11.2
	Rind (2)	1.72	0.052	0.084	14.3
11	Human (2)	3.02	0.646	0.830	12.2
	Rind (2)	1.66	0.068	0.104	13.6
22	Human (2)	2.83	0.813	1.110	12.8
	Rind (2)	1.92	0.064	0.101	14.2

Tab.3: Hämolysegrade und initiale Lactatkonzentrationen bei Experimenten mit Perfusionsmedia, die 1 - 2 Tage alte Rindererythrocyten oder 6 Wochen alte Humanerythrocyten als Sauerstoffträger enthielten.
Mittelwerte aus je 2 Experimenten mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Medium.

Aufgrund dieser Befunde scheint der Einsatz nicht-gealterter Erythrocyten für Perfusionsexperimente geeigneter zu sein. Es muß jedoch betont werden, daß die eigenen Versuche mit beiden Erythrocytenarten in wesentlichen Stoffwechselparametern (Glucoseaufnahme, Lactatproduktion) übereinstimmten. Hinweise auf eine durch stärkere Hämolyse bedingte gravierende Störung der Mikrozirkulation ergaben sich dabei nicht.
Ein kritischer Vergleich zwischen Perfusionsversuchen mit gealterten und frischen Erythrocyten wurde im übrigen kürzlich von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert (474).

Bei der Verwendung frischer Rindererythrocyten ist, wie schon erwähnt, ein gewisser Eigenstoffwechsel der Blutzellen zu berücksichtigen. Die Auswertung einer großen Anzahl von Rezirkulationsexperimenten ohne Organanschluß ergab jedoch eine nur geringe Glykolyserate während der einstündigen Perfusion (Tab.4).

	Stoffwechselrate (µmol/min × dl Perfusat)
Glucoseutilisation (55)	0.233 (± 0.089)
Lactatproduktion (55)	0.519 (± 0.052)
Pyruvatutilisation (55)	0.044 (± 0.007)

Tab. 4: Eigenstoffwechsel des Perfusionsmediums mit 1 - 2 Tage alten Rindererythrocyten (10 g Hb/dl) und einem Glucosegehalt von 11 mmol/l. Mittelwerte und s_{EM}.

Zeitlicher Ablauf der Hinterkörperperfusionen

Nach Vorperfusion des Präparates, dessen Medium verworfen wurde, erfolgte die rezirkulierende Perfusion im geschlossenen Kreislauf über einen Zeitraum von 7o Minuten. Nach einer zehnminütigen Äquilibrierungsphase, in der Substrat-, Tracer- oder Hormonzusätze zum Perfusat gemacht werden können, begann mit der ersten Probenentnahme aus dem Medium (Null-Zeitpunkt) die Auswertungsphase der Perfusion, die insgesamt 6o Minuten dauerte. Weitere Probenentnahmen schlossen sich im Abstand von 2o Minuten, in einigen Versuchsreihen auch 3o Minuten, an (Abb.13). Am Ende der Perfusion wurden beide Mm. gastrocnemii des Präparates mit einer Frierstop-Zange entnommen und in flüssigen Stickstoff überführt (124).

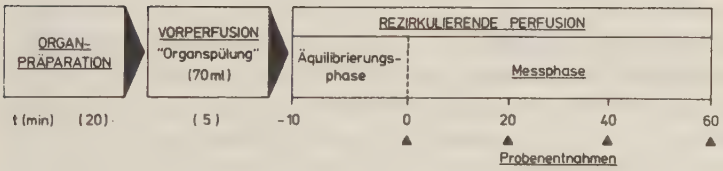


Abb.13: Zeitlicher Ablauf von Hinterkörperperfusionen unter Ruhebedingungen und nach akutem Erschöpfungszustand der Muskulatur.

Bei Untersuchungen mit Muskelbelastung während der Perfusion (untrainierte und trainierte Ratten) gliederte sich der Verlauf in drei Abschnitte von jeweils 2o Minuten Dauer. Entsprechend dem physiologischen Funktionszyklus der Skelettmuskulatur sind diese als Ruhephase (O - 2o Minuten),

Arbeitsphase (2o - 4o Minuten) und Erholungsphase (4o - 6o Minuten) gekennzeichnet (Abb.14).

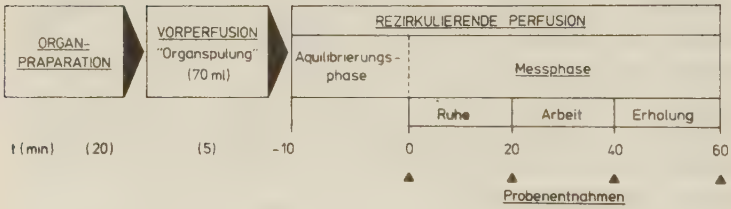


Abb.14: Zeitlicher Ablauf von Hinterkörperperfusionen mit in-vitro-Belastung untrainierter und trainierter Ratten.

Die in-vitro-Kontraktionen wurden ausgelöst durch Elektrostimulation der Nn. ischiadici (Rechteckimpulse mit einer Frequenz von 5/s, einer Dauer von 1 ms und einer Intensität von 1.2 - 2 V) unter Gewichtsbelastung beider Pfoten, um einen möglichst natürlichen Bewegungsablauf zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurden die in steigbügelartigen Lederschlaufen steckenden Pfoten durch am Tierkörper vorbeigeführte und über den Operationstisch herabhängende, mit 12 g-Gewichten versehene Nylonfäden in Dorsalflexion gebracht.
Der angegebene Stimulationsmodus bewirkte gleichmäßige, kräftige Kontraktionen der innervierten Muskulatur. Durch direkte Reizübertragung auf elektrodennahes Gewebe und retrograde Ausbreitung der elektrischen Impulse wurden weitere Muskelgruppen von der Stimulation betroffen. Der Gesamtanteil "arbeitender" Muskeln kann auf 4o - 6o % der

Hinterkörpermuskulatur geschätzt werden. Die zunächst sehr starken Beinausschläge gehen nach 2 - 3 Minuten in einen konstanten Rhythmus über, der bis zum Ende der Arbeitsphase ohne wesentliche Erhöhung der Stimulationsintensität anhält.

Perfusionskontrolle

Ein primärer und aktueller Kontrollparameter der Perfusion ist die makroskopische Beurteilung der Mikrozirkulation im Bereich der Pfoten. Die in der hypoxämischen Endphase der Organpräparation blaß-livide Verfärbung der Pfoten geht schon zu Beginn der Vorperfusion zurück. Die einsetzende Versorgung mit Perfusionsmedium führt in der Regel zu einer kurzzeitigen Hyperämie, die darauf in eine gleichmäßige, durch rötliche Farbe und deutliche Venenfüllung gekennzeichnete Durchblutung übergeht. Dieser Zustand verändert sich während der einstündigen Perfusion nicht und ist verbunden mit einem zweiten Kriterium der ausreichenden Sauerstoffversorgung, der "normalen" Durchflußrate. Die Durchblutung des Hinterkörpers in vivo ist, wie eigene Abflußmessungen aus der V. cava inf. narkotisierter, 17o - 24o g schwerer Ratten ergaben, mit etwa 4-7 ml/min anzugeben. Diese Messung stimmt weitgehend mit dem von N.B. RUDERMAN und Mitarbeitern kalkulierten Wert von 7.3 ml/min für den Hinterkörper einer 181 g Ratte überein (95). Von anderen Autoren wird eine deutlich geringere Flußrate angegeben (125).
Unter den gewählten Perfusionsbedingungen (hydrostatischer Druck von 8o mm Hg) liegt die kritische Durchblutungsschwelle, unterhalb der es zu verstärkter Lactatbildung kommt und die Perfusion abgebrochen werden sollte, bei 6 - 8 ml/min x 3o g Muskulatur.
Wie das folgende Beispiel eines Perfusionsprotokolls zeigt, liegen die Durchflußraten deutlich über diesem Schwellenwert (Tab.5). Gewöhnlich betragen sie unter den angegebenen

Versuchsbedingungen 12 - 14 ml/min.
Als weitere Meßgrößen, die zur Beurteilung des Perfusionsverlaufes heranzuziehen sind, werden pH- und pO_2-Werte des Perfusats kontinuierlich registriert (Tab.5).

Perfusionskontrolle: pH, pO_2, O_2-Gehalt, O_2-Verbrauch und Durchflußrate

	t (min)	pH_{art}	$pO_{2\ art}$	ml O_2/100 ml art	ml O_2/100 ml ven	O_2-Verbrauch µMol/min × g	Durchfluß ml/min × 30 g
NORM (13)	0	7.356	467	13.9	11.4	0.55	14.3
	20	7.371	407	13.5	10.9	0.52	13.1
	40	7.362	377	13.3	11.0	0.49	13.5
	60	7.359	368				13.9
ADX (8)	0	7.396	505	13.9	11.7	0.50	15.7
	20	7.396	419	13.6	11.4	0.46	14.7
	40	7.384	403	13.6	11.4	0.46	14.6
	60	7.366	384				14.7
ADX+B (8)	0	7.377	455	13.6	11.1	0.52	14.2
	20	7.386	419	13.2	10.8	0.48	13.6
	40	7.375	404	13.0	10.5	0.48	13.1
	60	7.366	371				12.5

Tab.5: Beispiel für Kontrolldaten von Hinterkörperperfusionen normaler (NORM), adrenalektomierter (ADX) und betamethason-behandelter adrenalektomierter Ratten(ADX + B) nach 24-stündigem Nahrungsentzug.

Während der Perfusionen kommt es zu einem nur geringen Abfall des pH-Wertes, der mit der Lactatfreisetzung im Verlaufe der Perfusion korreliert. Der venöse pH-Wert liegt um 0.o2 - 0.o3 Einheiten niedriger als der entsprechende arterielle Wert.
Die Verschiebung des supraphysiologischen O_2-Partialdruckes ist durch abnehmende Oxygenatorfüllung und Zumischung von Außenluft zum Carbogengemisch des im Unterdruck (1o - 2o mm Wassersäule) befindlichen Perfusionssystems während der Probenentnahmen bedingt. Der venöse

pO_2 ist weitgehend konstant und stellt sich zwischen 5o - 8o mm Hg ein.
Der arterielle Sauerstoffgehalt liegt um etwa 15 % unter dem des Rattenblutes in vivo, während der venöse keinen Unterschied zeigt. Die geringere arterio-venöse Differenz in vitro wird durch die hohe Durchflußrate ausgeglichen.

Die im Protokoll nicht dargestellte Hämolyserate im Perfusionsverlauf ist sehr gering: der Hämoglobingehalt des Perfusatplasmas steigt von durchschnittlich 0.o6o g/dl zu Beginn auf 0.1oo g/dl am Ende der Perfusion an.
Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen tritt eine Ödembildung des Gewebes während der Perfusion nicht ein. Das Trockengewicht der Muskulatur betrug, mit Ausnahme höherer Werte in zwei Versuchsgruppen mit hyperosmolaren Bedingungen, zwischen 23 und 26 % des Gewebefeuchtgewichts. Es lag damit im Bereich des in-vivo-Wertes,der mit 24.9 % ($\pm$ 1.1 s_E) (n = 17) anzugeben ist.
In Übereinstimmung mit diesem Befund soll es, aufgrund der Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (96, 97, 126), zu keiner Veränderung des Extracellulärraumes kommen; er beträgt durchschnittlich 0.2 ml/g Muskulatur.
Ebenso konnten elektronenmikroskopisch keine perfusionsbedingten morphologischen Veränderungen des Muskelgewebes gegenüber dem in-vivo-Bild festgestellt werden (95, 444).

Eine gewisse Aussagekraft über die celluläre Integrität bei Organperfusionen wird seit langem, neben dem relativ groben Zeichen eines gesteigerten Enzymaustritts, Kaliumverschiebungen in den Intravasalraum beigemessen. Bekannt ist beispielsweise der Kaliumausstrom bei der Perfusion geschädigter Rattenlebern (127). Die tatsächliche Relevanz des Kaliumverlustes aus der Zelle als pauschales Kriterium eines schlechten Funktionszustandes des perfundierten Organs ist jedoch umstritten (128).
Auch bei Hinterkörperperfusionen ist regelmäßig ein leichter Anstieg der Kaliumkonzentration im Perfusat fest-

zustellen, obwohl metabolisch und morphologisch keinerlei Anhaltspunkte für eine Schädigung des Präparates vorliegen. Eine wesentliche Ursache dieses Befundes scheint, neben der hämolysebedingten Kaliumfreisetzung, die veränderte hormonelle Situation in vitro zu sein; denn unter Insulinzusatz zum Perfusionsmedium kommt es zu einer Umkehr dieses Phänomens, nämlich einer Kaliumaufnahme in die Muskulatur (Tab.6).

	Perfusat - Kalium (mmol/l)	
	0 min	60 min
Perfusion ohne Insulin	(6) 5.70 (± 0.18)	(6) 6.16 (± 0.11)
Perfusion mit Insulin (1mU/ml)	(8) 5.29 (± 0.20)	(8) 4.55 (± 0.20)

Tab.6: Intra-extracelluläre Kaliumverschiebungen während Hinterkörperperfusionen der Ratte. Der geringe, nach außen gerichtete Kaliumstrom wird unter Insulinzusatz (1 mU/ml) zum Perfusat aufgehoben. Mittelwerte und s_{EM}.

Abschließend soll kurz auf die Bedeutung der energiereichen Phosphate der Muskulatur für die "post-experimentelle" Beurteilung des Perfusionsverlaufes eingegangen werden. Wie die folgende Tabelle zeigt, liegen sie bei Perfusionen, die aufgrund der oben dargestellten aktuellen Kontrollparameter als normal zu bezeichnen sind, innerhalb des in-vivo-Bereiches (Tab.7).

	Creatin-Ⓟ und Adeninnucleotide (µmol/gFG)			
	CP	ATP	ADP	AMP
in vivo (Ruhebedingungen) (6)	20.51 (± 0.27)	7.68 (± 0.10)	0.830 (± 0.025)	0.034 (± 0.004)
in vivo (nach Laufbelastung) (6)	5.66 (± 0.72)	4.56 (± 0.21)	0.844 (± 0.051)	0.110 (± 0.009)
in vitro (nach 60 min Perfusion) (5)	21.79 (± 0.90)	7.83 (± 0.09)	0.875 (± 0.022)	0.031 (± 0.003)

Tab. 7: Creatinphosphat- und Adeninnucleotidgehalte des Musculus gastrocnemius bei narkotisierten Ratten im Ruhezustand, nach Arbeitsbelastung und am Ende einstündiger Hinterkörperperfusionen. Mittelwerte ± s_{EM}.

Eine hypoxämische Schädigung der nicht-belasteten Muskulatur ist sehr frühzeitig an einem Abfall des Gehaltes an Creatinphosphat(CP) und einem Anstieg des Adenosinmonophosphatgehaltes (AMP) abzulesen; die Konzentrationen von Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) bleiben über lange Zeit relativ konstant. Deutliche Veränderungen dieser Adeninnucleotide unter Ruhebedingungen sind erst bei Schädigungsgraden zu erwarten, die auch makroskopisch nicht zu übersehen sind.

Als letzter Hinweis auf die Validität des perfundierten Hinterkörperpräparates kann ein Befund gelten, der bei Perfusionen mit einer 2o-minütigen Arbeitsphase zu erheben ist (Tab.8).

Die Resynthese der energiereichen Phosphate verläuft sehr rasch. Innerhalb einer Erholungsphase von nur 2o Minuten kommt es zu einer praktisch vollständigen

	Creatin-Ⓟ, Adeninnucleotide (µmol/gFG) und Lactat/Pyruvat-Quotient im Perfusat				
	CP	ATP	ADP	AMP	Lac/Pyr
Perfusionsphase: Ruhe (0-20 min) (9)	20.06 (±0.49)	7.54 (±0.14)	0.838 (±0.018)	0.032 (±0.003)	8.6 (±0.4)
Arbeit (20-40min) (6)	7.44 (±1.00)	5.13 (±0.21)	0.753 (±0.018)	0.097 (±0.011)	19.9 (±1.4)
Erholung (40-60min) (9)	20.12 (±0.84)	6.01 (±0.32)	0.785 (±0.025)	0.027 (±0.003)	13.3 (±0.7)

Tab.8: Creatinphosphat und Adeninnucleotide im M.gastrocnemius des perfundierten Hinterkörpers nach 20-minütiger Elektrostimulation der Nn.ischiadici und am Ende der sich anschließenden 20-minütigen Erholungsphase (Perfusionsablauf siehe Abbildung 14). Mittelwerte und s_{EM}.

Restitution der zuvor erheblich ausgeschöpften Energiereserve der perfundierten Muskulatur. Auch dieser Befund läßt sich durchaus mit den in-vivo-Verhältnissen vergleichen (129).

3. Analytische Verfahren

Bei der Auswertung der Untersuchungen wurde weitgehend auf analytische Standardverfahren zurückgegriffen, die sich an die Besonderheiten der Perfusionsversuche adaptieren ließen. Substrate, Metabolite und andere Bestandteile des Mediums wurden teils im $HClO_4$(0.33-1 mol/l)-Extrakt, teils im abzentrifugierten Perfusatplasma analysiert.
Zur Bestimmung von Muskelmetaboliten wurden Proben des M. gastrocnemius nach feinster Pulverisierung unter flüssigem Stickstoff (MIKRODISMEMBRATOR ^{R}; B.Braun, Melsungen) ebenfalls mit Perchlorsäure extrahiert.
Außer für die Glucosebestimmung wurden die $HClO_4$-Extrakte mit KOH-Lösung (2 mol/l) in einem Titrationsgerät mit automatischer Endpunktabschaltung (Radiometer, Kopenhagen) neutralisiert oder auf den für die Analyse geeigneten pH-Wert eingestellt. Die Neutralisation des Säureextraktes für die Pyruvatbestimmung erfolgte mit einer K_3PO_4-Lösung (o.7 mol/l). Die in der Kälte auskristallisierten $KClO_4$-Niederschläge wurden durch Zentrifugation oder Filtration beseitigt.
Die Konzentration verschiedener Substanzen (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Pyruvat, Citrat, energiereiche Phosphate, unveresterte Fettsäuren) wurden noch am Perfusionstag bestimmt, die übrigen Proben bis zur Analyse bei -25°C oder unter flüssigem Stickstoff (Muskelproben) aufbewahrt.

Die folgende tabellarische Zusammenstellung gibt eine Übersicht über die angewandten Analysenverfahren. Alle Messungen erfolgten in Spektrallinienphotometern mit Drucker- oder Schreiberanschluß (Eppendorf Gerätebau, Hamburg).

Glucose:	Enzymatischer Farbtest mit Glucose-Oxidase GOD, EC 1.1.3.4), Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) und ABTS (2,2'-Azino-di-(3-äthyl-benz-thiazolin) -6-sulfonat) als Chromogen (130-132) (Biochemica-Test-Combination: Blutzucker-GOD-Perid-Methode; Boehringer, Mannheim)
Lactat:	UV-Test mit Lactat-Dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1. 27) und NAD^+ (133)

Pyruvat: UV-Test mit Lactat-Dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) und NADH (132,134)
(Biochemica-Test-Combination: Pyruvat; Boehringer, Mannheim)

Alanin: UV-Test mit L-Alanin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.1) und NAD^+ (135)

Glutamat: UV-Test mit Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3) und NAD^+ (588)

Glutamin: als Differenz der Glutamatkonzentration vor und nach Hydrolyse des im neutralisierten Extrakt enthaltenen Glutamins mit Glutaminase (EC 3.5.1.2) (589)

Aminosäurentrennung durch Säulenchromatographie:

Zur Bestimmung der Aminosäurenspektren wurden 0.5 ml Blut oder Perfusat mit 3 ml Sulfosalicylsäure (38 g/l) enteiweißt (594) und ein Aliquot des Überstandes gefriergetrocknet. Zur automatischen Aminosäurenanalyse (593) mit dem Chromatographie-System LC 6000 (Biotronik, München) wurden die gefriergetrockneten Proben in 0.5 ml - 1.0 ml Probenverdünnungspuffer (0.067 mol/l Lithiumcitrat, pH 1.8) mit DL-Norleucin als internem Standard (0.125 mmol/l) aufgenommen; Aliquots der Probe wurden dann im Einsäulenverfahren an dem Kationenaustauscher DC-6A (Säule: 0.8x35 cm) aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit Lithium-Citrat-Puffer, unter Anwendung eines Temperaturprogramms (595); zum Nachweis der Aminosäuren wurde Ninhydrin verwendet.

Glycerin: UV-Test mit Glycerokinase (GK, EC 2.7.1.30), Pyruvat-Kinase (PK, EC 2.7.1.40), Lactat-Dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) und NADH (132,136)
(Biochemica-Test-Combination: Neutralfett (Triglyceride); Boehringer, Mannheim)

Unveresterte Fettsäuren: Farbtest nach Extraktion der Fettsäuren als Kupfersalze und anschließende Kupferbestimmung mit Diäthyldithiocarbaminat (137)
(Biochemica-Test-Combination: Unveresterte Fettsäuren; Boehringer, Mannheim).
Bei jeder Probenreihe wurde ein Kontrollwert ohne Reagenzzusatz mitgeführt, um Störungen durch unterschiedliche Hämolysegrade auszuschließen.

Elektrolyte: (K^+,Na^+,Ca^{++}) Emissionsphotometrischer Test unter Bezug auf Standardlösungen der einzelnen Elektrolyte (138, 139)
(Flammenphotometer Eppendorf: Eppendorf Gerätebau, Hamburg)

Hämoglobin: Photometrischer Test auf der Grundlage der Umwandlung von Hämoglobin in Hämiglobincyanid (140)

Harnstoff: Enzymatischer Farbtest mit Urease (EC 3.5.1.5) und nachgeschalteter Indikatorreaktion der freigesetzten Ammoniumionen mit Phenol und Hypochlorid. Zu jeder Probe wurde ein Kontrollwert ohne Urease-Zusatz ermittelt, um Störungen durch Hämolyse oder primär vorhandene Ammoniumionen auszuschließen. Die Analyse wurde im Rahmen kombinierter Leber-Hinterkörper-Perfusionen durchgeführt (132,141,142) (Biochemica-Test-Combination: Harnstoff; Boehringer, Mannheim)

Gesamte freie Aminosäuren (α-Amino-Stickstoff):

Farbtest auf der Grundlage der Ninhydrinreaktion mit α-Aminogruppen unter Quantifizierung durch Extinktionsvergleich mit einer Glycin-Eichkurve (143).

Muskelmetabolite

Glucose, Lactat und Pyruvat:

nach den oben angegebenen Analysenverfahren

Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat:

UV-Test mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49), $NADP^+$ und Phosphoglucose-Isomerase (EC 5.3.1.9) (590)

Citrat: UV-Test mit Citratlyase (EC 4.1.3.6), NADH und Malatdehydrogenase/Lactatdehydrogenase als Indikator-Enzyme (591)

ATP und Creatinphosphat (CP): UV-Test mit Hexokinase (HK, EC 2.7.1.1), Creatin-Kinase (CK, EC 2.7.3.2), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH, EC 1.1.1.49) und $NADP^+$ (144)

ADP und AMP: UV-Test mit Pyruvat-Kinase (PK, EC 2.7.1.40), Lactat-Dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27), Myokinase (MK, EC 2.7.4.3) und NADH (132,145); (Biochemica-Test-Combination: ADP/AMP; Boehringer, Mannheim)

Glykogen: Farbtest mit Anthron-Reagenz nach alkalischer Gewebeauflösung und Glykogenisolierung durch zweimalige Äthanolfällung unter LiCl-Zusatz (3 g/l Äthanol)(146,147)

Sauerstoffgehalt im arteriellen und venösen Perfusionsmedium:

Elektrochemische Messung in einem Gerät mit O_2-spezifischer Meßzelle, in der ein dem Sauerstoffgehalt proportionaler Strom erzeugt wird ("Coulometric Cell" nach P.A.HERSCH. Gerät: LEX-O_2-CON Total Oxygen Content Analyser; Lexington Instruments, Waltham, Mass. USA) (148)

$^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)Glucose und (U-^{14}C)Aminosäuren:

Absorption des aus dem Perfusionssystem abgesaugten CO_2 in einer Äthanolamin-Äthylenglykolmonomethyläther-Mischung (1:2 v/v); zur Aktivitätsmessung wurde ein Aliquot der Mischung in dem 8-fachen Volumen eines Toluol-Scintillators für organische Proben aufgenommen (149).
Die Messung erfolgte im TRICARB^R Modell 3380 (Packard Instrument, Frankfurt); als interner Standard diente (^{14}C) Toluol.

^{14}C-Alaninbildung aus (U-^{14}C)Glucose und (U-^{14}C) Aminosäuren:

Isolierung der freien Aminosäuren des Perfusionsmediums durch Ionenaustauschchromatographie an AMBERLITE IR 120-H^+-Form (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) und Elution mit NH_4OH-Lösung (2 mol/l). Eindampfen der radioaktiven Fraktionen im Vakuum und Resuspension des Rückstandes in Wasser.
Isolierung der Alaninfraktion durch Hochspannungselektrophorese in einer Essigsäure-Ameisensäure-Wasser-Mischung (120:26:1000) bei 4000 V/80 mA für 20 Minuten (CAMAG-HVE-System; Camag, Berlin) (150).
Nach Elution der Alanin-Zone mit Wasser, erneutem Eindampfen des Eluates und Resuspension in Wasser erfolgte die Radioaktivitätsmessung mit Diotol-Szintillator (151) und die enzymatische Alaninanalyse (135) als Grundlage der spezifischen Aktivitätsbestimmung.
Durch Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie konnte die Anwesenheit anderer Substanzen in der Alaninfraktion ausgeschlossen werden.

Bestimmung der Muskel-Trockensubstanz:

Wägung eines Gewebestückes vor und nach 24-stündiger Trocknung bei 105°C. Ermittlung des Trockengewichtsanteils, bezogen auf 1 g Muskelfeuchtgewicht.

Die bei den Perfusionen und Testverfahren verwendeten Chemikalien, Enzyme und Coenzyme entsprachen den Qualitätsanforderungen an die biochemische Analytik; sie wurden von folgenden Herstellerfirmen bezogen: E. Merck, Darmstadt; Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim; C.Roth, Karlsruhe; Serva Feinbiochemica, Heidelberg; Sigma Chemie, München. Durch Einsatz von Kontrollseren (PRECINORM-S^{R}, PRECILIP^{R}; Boehringer, Mannheim) und Standardlösungen (als Zusatz zu Testansätzen) wurden Präzision und Richtigkeit der Analysen überprüft.

Übersicht über spezielle Präparate und Applikationsverfahren

a) Rindererythrocyten: Frisches, durch Carotiden- oder Herzstich gewonnenes Rinderblut wurde im örtlichen Schlachthof in 1 l-Flaschen, die 250 ml Citronensäure-Glucose-Stabilisator (ACD-Stabilisator BIOSTABIL^{R}; Biotest-Serum-Institut, Frankfurt) und 300 mg Ampicillin (BINOTAL^{R}; Bayer, Leverkusen) enthielten, abgefüllt. Bis zur Isolierung der Erythrocythen in der beschriebenen Weise (siehe Tab.2) wurde das Blut bei 4-8^{o}C aufbewahrt.

b) Rinderserumalbumin: Als Albuminpräparate wurden ausgesuchte, lipidarme Chargen von PENTEX^{R} Bovine Albumin Fraction V Powder (Code No.81-003; Miles, Frankfurt) eingesetzt. Nach zweitägiger Dialyse in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (siehe Tab.2) wurde die Proteinlösung bei -25^{o}C eingefroren und vor Herstellung des Perfusionsmediums hochtourig (8000 rpm/20 min) zentrifugiert und zusammen mit der Erythrocytensuspension durch ein engmaschiges Nylongewebe filtriert.

c) Narkosepharmaka: Die Narkose der Tiere wurde durch intraperitoneale Injektion von Hexobarbital-Natrium (EVIPAN^{R}-Na; Bayer, Leverkusen) herbeigeführt. Die Dosierung betrug 15 mg/100 g Körpergewicht.
Durch Injektion von 1000 USP-Einheiten Heparin (LIQUEMIN^{R} 25000; Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) wurde gleichzeitig die Blutgerinnung aufgehoben.

d) Betamethasonpräparat: Als Glucocorticoid wurde Betamethasondinatriumphosphat (CELESTAN^{R} solubile; Byk-Essex, München) verwendet. Die Dosierung bei Kurzzeit- und Langzeitexperimenten wurde bereits im Zusammenhang mit der Beschreibung der Tiervorbereitung angegeben.

e) Insulinpräparate: Für die Untersuchung akuter Insulineffekte in vitro wurde hochgereinigtes Normalinsulin aus Schweinepankreas verwendet (ACTRAPID^{R}; Novo Industrie Pharmaceutica, Mainz, oder INSULIN LEO^{R}; Nordisk Insulin-Laboratorium, Kopenhagen). Die Originalpräparate wurden am Perfusionstag

mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und in der jeweils angegebenen Dosierung (0.5 oder 1.0 mU/ml) kurz vor Perfusionsbeginn dem Medium zugesetzt.
Bei Experimenten mit in-vivo-Substitution wurde das Depotpräparat MONOTARD^R (Novo Industrie Pharmaceutika, Mainz) verwendet. Das Applikationsschema ist den Angaben zur Tiervorbereitung zu entnehmen.

f) Actinomycin D und Cycloheximid: Actinomycin D (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) wurde in 1 ml kalter, CO_2-angereicherter physiologischer NaCl-Lösung gelöst und als 400 µg-Dosis/Ratte vier Stunden vor der Perfusion intraperitoneal verabreicht (30 min vor Glucocorticoidapplikation). Diese im Vergleich zu Leberexperimenten (152) sehr hohe Dosierung soll in extrahepatischen Geweben zur Blockierung von Enzyminduktionen führen (153).
Cycloheximid (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) wurde nach dem gleichen Schema in einer Dosis von 20 mg/kg intraperitoneal injiziert. Nach Ergebnissen anderer Autoren wird unter diesen Bedingungen die Proteinsynthese inhibiert (592,598).

g) D-(U-^{14}C)Glucose und L-(U-^{14}C)Aminosäuren (Aspartat, Leucin, Valin): In Versuchen mit Messung der $^{14}CO_2$- und ^{14}C-Alaninbildung wurde 20 µCi der radioaktiv markierten Glucose oder der markierten Aminosäuren (Amersham Buchler, Braunschweig) in der Äquilibrierungsphase der Perfusion (5 min vor der ersten Probenentnahme) dem Medium zugesetzt.

Berechnungsgrundlagen und statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Berechnung von Aufnahme- und Freisetzungsraten des Hinterkörperpräparates erfolgte auf der Grundlage der Konzentrationsbestimmungen der Substrate zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten (siehe Abb.13) unter Berücksichtigung der vorhandenen Perfusat- und entnommenen Probevolumina.

Die allgemeine "Bilanzierungsformel" ist folgendermaßen anzugeben:

$$\Delta M_{1-2} = M_2 - (M_1 - P_1)$$

Dabei sind: ΔM_{1-2} = Aufnahme (-) oder Freisetzung (+) eines Substrates zwischen den Entnahmezeitpunkten t_1 und t_2; M_1 = die gesamte Substratmenge im Perfusat zum Zeitpunkt t_1; P_1 = die Substratmenge in der zum Zeitpunkt t_1 entnommenen Probe und M_2 = die gesamte Substratmenge im Perfusat zum Zeitpunkt t_2.
Die auf diese Weise für die drei Perfusionsphasen (siehe Abb.13 und 14) ermittelten Werte wurden, außer in Versuchen mit in-vitro-Arbeitsbelastung, kumulativ addiert und in dieser Form in Diagrammen und Tabellen wiedergegeben.
Einheitliche Bezugsgröße ist, wie oben schon dargestellt, "30 g Muskulatur" - die gesamte perfundierte Muskelmasse einer 180 g schweren, 24 h-gehungerten Ratte.

Muskelmetabolite:

Die primäre Bezugsgröße für die Konzentration der Muskelmetabolite ist das Gewebefeuchtgewicht (FG). Bei Metaboliten, deren Konzentration im Extracellulärwasser nicht zu vernachlässigen ist, wurde in der Regel der Gehalt im Intracellulärwasser der Muskelfaser angegeben. Der Berechnung liegt, in Übereinstimmung mit anderen Autoren (126), folgende Formel zugrunde:

$$C_{ic} = \frac{C_M - (C_p \times E)}{W - E}$$

$$= \frac{C_M - (C_p \times 0.2)}{0.57}$$

Bei dieser Berechnung ist:

C_{ic} = Metabolitkonzentration im intracellulären Muskelfaserwasser ($\mu mol/ml_{ic}$),

C_M = die auf Muskelfeuchtgewicht bezogene Metabolitkonzentration (µmol/g FG),

C_P = Metabolitkonzentration (µmol/ml) im Plasmawasser des Perfusionsmediums; sie ergibt sich, aufgrund des unterschiedlichen Wassergehaltes von Vollperfusat (85%) und Plasma (94%), durch Multiplikation der Vollperfusat-Konzentration mit dem Faktor 1.11,

E = Anteil des Extracellulärraums am Muskelfeuchtgewicht (o.2 ml/g),

W = gesamter Wasseranteil am Muskelfeuchtgewicht (o.77 ml/g).

Bei unterschiedlichem Wassergehalt der Muskelproben erfolgte die Umrechnung auf das Trockengewicht. Sie soll am Beispiel des Glykogens dargestellt werden:

$$\frac{\text{mg Glykogen}}{\text{g Muskel-FG}} \times \frac{1}{\text{TG-Anteil}} \triangleq \frac{\text{mg Glykogen}}{\text{g Muskel-TG}}$$

Wird der Glykogengehalt nicht in mg, sondern als µmol Glucoseeinheiten angegeben, so gilt folgender Umrechnungsfaktor:

$$\text{mg Glykogen} \times \frac{1000}{180.159-18.015} \triangleq \text{µmol Glucose im Glykogen}$$

Umrechnungsfaktor = 6.1674

Berechnung des Sauerstoffverbrauchs:

Die Berechnung erfolgte auf der Grundlage der arterio-venösen Differenz (AVD) des Sauerstoffgehaltes im Perfusat unter Berücksichtigung der Durchblutungsgröße:

$$\text{µmol } O_2/\text{min} = \frac{\text{AVD-}O_2 \text{ (ml/ml)} \times 1000}{22.4} \times \text{Durchfluß (ml/min)}$$

Darstellung der Ergebnisse und statistische Vergleiche:

Als Maßzahlen der Stichproben sind, soweit nicht besonders gekennzeichnet, die Mittelwerte $\bar{x}$ und deren Standardabweichung s_{EM} angegeben.

Der statistische Vergleich zweier Stichproben erfolgte mit dem t-Test nach STUDENT (154,155) für ungruppierte, nicht gepaarte Daten (Freiheitsgrad $f = n_1+n_2-2$). Als Signifikanzkriterium wurde $p<0.05$ gewählt (156). Im Text der Arbeit diskutierte Befunde und Effekte erfüllen, auch wenn nicht besonders darauf hingewiesen wird, dieses Kriterium.
In der allgemeinen Übersicht dargestellte Abbildungen ohne Literaturhinweis beruhen auf eigenen Befunden.

III. In-vivo-Status der Ratten zum Untersuchungszeitpunkt: Reaktion auf Änderungen der extracellulären Glucoseverfügbarkeit bei intakten und adrenalektomierten Ratten

1. Nahrungsabhängige Adaptationsmechanismen bei Normaltieren

Die Umstellung des Stoffwechsels intakter Ratten als Antwort auf einen akuten Nahrungsentzug erfolgt, wie schon dargestellt wurde, außerordentlich rasch (9o). Bereits nach etwa 12 Stunden ist ein annähernd stationärer Zustand erreicht (siehe Abbildung 7).
Aufgrund eigener Befunde werden innerhalb einer Fastenperiode von 24 Stunden das Leberglykogendepot entleert und der Glykogengehalt der Muskulatur um 3o % verringert; die in der absorptiven Phase hohen Glucosekonzentrationen des Blutes sinken ab und stabilisieren sich in einem Bereich, der an oder unterhalb der Sekretionsschwelle für Insulin (91, 157) liegt (Abb.15).

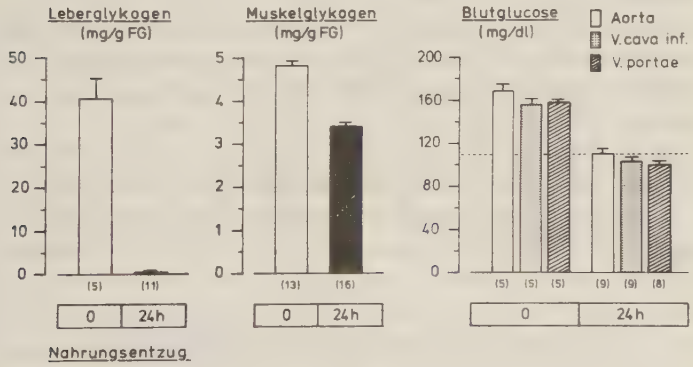


Abb.15: Glykogengehalt der Leber und des M. gastrocnemius und Glucosegehalt des Blutes in Aorta, V. cava inf. und V. portae vor und nach 24-stündigem Nahrungsentzug bei intakten Ratten. Mittelwerte und s_{EM}.

Mit der Abnahme der Glucoseverfügbarkeit ist ein Konzentrationsanstieg der freien Fettsäuren und, zeitlich etwas später einsetzend, der Ketonkörper im Plasma verbunden. Synchron dazu verläuft die ketogenetische und gluconeogenetische Kapazität der isoliert perfundierten Leber (90). Während Fettsäuren und Ketonkörper als Glucosesubstituenten im Energiestoffwechsel der Muskulatur und anderer extrahepatischer Gewebe herangezogen werden können, bildet der Gluconeogeneseprozeß die Grundlage für die Aufrechterhaltung des Blutglucosespiegels. Seine Funktion und Effektivität ist gebunden an die gleichzeitig eintretende Veränderung des Proteinumsatzes des Muskelgewebes im Sinne einer verminderten Synthese- und einer zeitlich verzögert eintretenden, gesteigerten Abbaurate (158-162). Daneben wird der Transport von Aminosäuren in Muskulatur und Leber modifiziert: während die Aufnahme von α-Aminoisobuttersäure (AIB), einer über das "alanine-preferring"-System transportierten Aminosäure, in die Leber erhöht wird (163, 598), kommt es zu einer Abnahme der Einschleusung in das Muskelgewebe (163).

In Übereinstimmung mit diesen Veränderungen des extrahepatischen Aminosäurenstoffwechsels ist am gehungerten, eviscerierten-nephrektomierten Tier eine Aminosäurenakkumulation zu messen, die sich mit dem Freisetzungsmuster des isoliert perfundierten Hinterkörpers weitgehend deckt (Abb. 16).

Die gleichzeitig an der intakten Ratte zu beobachtenden Veränderungen der Aminosäurenkonzentration im Blut sind eine Resultante der unterschiedlichen gewebespezifischen Aufnahme- und Freisetzungsraten. So fällt beispielsweise im Blut der hungernden Tiere die Alaninkonzentration aufgrund der hohen hepatischen Extraktion ab (Tab. 9), obwohl eine erhebliche Steigerung der Freisetzungsrate aus den extrahepatischen Geweben erfolgt.

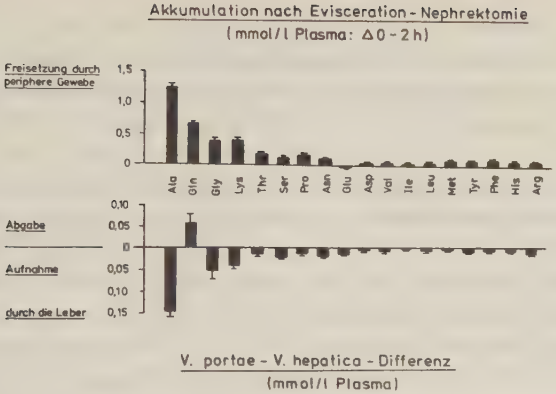


Abb. 16: Akkumulation von Aminosäuren im Plasma 24 h-gehungerter Ratten innerhalb eines Zeitraumes von zwei Stunden nach Evisceration-Nephrektomie (oben) und Aminosäurenextraktion durch die Leber von Ratten nach einem 24-stündigen Nahrungsentzug (unten).
Die hervorragende Stellung des Alanins innerhalb dieser Phase der Stoffwechselanpassung an den Hungerzustand wird sehr deutlich (nach 62).

Alaninkonzentration in Blut (µmol/ml), Muskel und Leber (µmol/g FG)

	Leber	V. portae	V. cava	Muskel	Aorta
gefüttert	(4) 2.756 (±0.178)	(9) 0.485 (±0.023)	(9) 0.360 (±0.011)	(12) 1.866 (±0.046)	(9) 0.402 (±0.020)
24h gehungert	(4) 0.727 (±0.160)	(12) 0.333 (±0.011)	(9) 0.211 (±0.009)	(19) 2.004 (±0.049)	(9) 0.180 (±0.009)

Tab. 9: Veränderungen der Alaninkonzentration in Blut, M. gastrocnemius und Leber innerhalb eines 24-stündigen Nahrungsentzugs. Mittelwerte und s_{EM}.

Entsprechend der gesteigerten glucogenetischen Umwandlung sinkt auch die intrahepatische Alaninkonzentration ab, während sie im M. gastrocnemius unverändert bleibt. Andere

Autoren beschrieben ähnliche Ergebnisse (51).
Im Gegensatz zur Hypoalaninämie als Folge des gesteigerten Gluconeogenesebedarfes ist bei Untersuchungen am Menschen ein rascher Anstieg verschiedener anderer Aminosäuren im Blut festzustellen, unter denen die essentiellen verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin sich besonders hervorheben (8, 164, 165). Untersuchungen an Ratten zeigten, daß ihr Umsatz vorwiegend in der Muskulatur erfolgt (166-168, 514) und offensichtlich einer komplexen Kontrolle durch Substrate und Hormone unterliegt (169, 17o, 172). Die Oxidationsrate steigt im Hungerzustand an (168, 5o6); dabei läßt sich eine Parallele zu der in vitro zu beobachtenden Stimulation der muskulären Alaninsynthese durch artifizielles Angebot dieser Aminosäuren herstellen (8o, 47, 78, 82, 83, 5o6, 469).
Möglicherweise ist eine frühzeitige Einschleusung der verzweigtkettigen Aminosäuren in den Intermediärstoffwechsel der Muskulatur mit entsprechender positiver Rückwirkung auf die Alaninbildung (469) und Energiebereitstellung (171) der Grund für das gegenüber dem Menschen abweichende Bild bei der hungernden Ratte. Die Konzentrationszunahme der erwähnten Aminosäuren im Blut dieser Tiere ist geringer ausgeprägt und erfolgt verzögert; erst nach mehrtägigem Nahrungsentzug wurde ein intracellulärer Anstieg in der Muskulatur gemessen (51, 515).
Eine schlüssige Aussage über die subcellulären Steuermechanismen dieser im Rahmen der Glucosehomöostase im frühen und der Proteinkonservierung im fortgeschrittenen Hungerzustand (8) relevant erscheinenden Wege des extrahepatischen Aminosäurenstoffwechsels und der Wechselbeziehungen zum Umsatz anderer Substrate ist bisher nicht möglich. Das gilt auch für Verbindungen, die sich zur Fettsäuren- und Ketonkörperutilisation einerseits (169, 88) und zur Glucose- und Pyruvatoxidation andererseits (169, 17o) ergeben. Eine zentrale Schaltfunktion scheint dabei dem jeweiligen Aktivitätsstatus des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes zuzukommen (17o). Verschiedene Befunde

sprechen dafür, daß zwischen Pyruvatoxidation und Oxidation der verzweigtkettigen Aminosäuren ein reziprokes Verhältnis besteht (169); ein ähnliches Verhältnis wurde im übrigen auch für die Rate der Alaninfreisetzung aus peripheren Geweben beschrieben (173).

Nahrungsabhängige Veränderungen der Glucoseutilisation und der Bereitstellung glucoplastischer Vorläufer durch den Rattenhinterkörper in vivo

Eine orientierende Aussage über die in-vivo-Reaktion des für die in-vitro-Untersuchungen verwendeten Körperabschnittes auf Nahrungsentzug wird durch Ergebnisse arterio-venöser Differenzmessungen zwischen Aorta und V.cava inf. ermöglicht. Bei der Gegenüberstellung der gewonnenen Daten mit den am Perfusionsmodell erhobenen Befunden ist jedoch zu berücksichtigen, daß das in-vivo-Bild von einer Vielzahl hormoneller Faktoren und schwer überschaubarer Substratinterferenzen bestimmt wird.
Als typische Merkmale der Anpassung an die reduzierte Glucoseverfügbarkeit sind bei diesen Untersuchungen eine verminderte Glucoseextraktion aus dem Blut und eine Freisetzung der Gluconeogenesesubstrate Lactat, Pyruvat und Alanin zu messen (174,175). Alle drei Substrate werden unter Nahrungszufuhr durch die Gewebe des Hinterkörpers aufgenommen (Abb. 17).

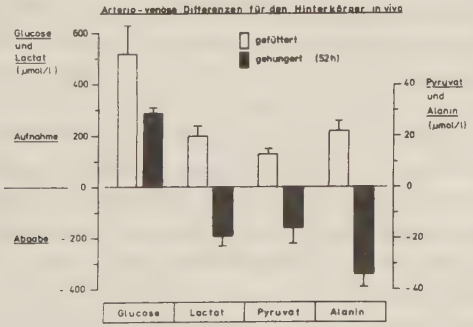


Abb. 17: Konzentrationsdifferenzen (µmol/l) zwischen V.cava inf. und Aorta für Glucose, Lactat, Pyruvat und Alanin im Blut gefütterter und gehungerter Ratten (nach 174) (+ = Aufnahme, − = Abgabe).

Die Stoffwechselumschaltung im vorwiegend muskulären Gewebe des Hinterkörpers in vivo erfolgt komplementär zu Veränderungen in der Leber. Während die Leber in dem durch Hormone und Substrate kontrollierten Mechanismus der Gluconeogenese die fehlende exogene Glucosezufuhr durch gesteigerte endogene Glucoseproduktion ausgleicht (39, 4o, 25, 9o, 176), wird die Ausschöpfung der im Blut verfügbaren Reserve glucoplastischer Vorläufer durch die Veränderungen der Substratutilisation des extrahepatischen Gewebes verhindert.
Basis der sich neu einstellenden Homöostase ist eine "Glucosekonservierung", die durch die Einschränkung des peripheren Glucoseverbrauches und die erhöhte Rückgewinnung der Glykolysemetabolite Lactat und Pyruvat ermöglicht wird. Damit stimmt überein, daß schon nach 15-stündiger Nahrungskarenz der Ratte über 5o % der Blutglucose auf eine Resynthese aus Glucoseabbauprodukten zurückzuführen ist (177). Gleichzeitig nimmt die aus der Glucoseoxidation abzuleitende CO_2-Produktion von etwa 4o % im Futterzustand auf 2o % im Hungerzustand ab (178).
Quantitativ bedeutsamstes Substrat der "konservierenden" Gluconeogenese ist Lactat (Abb. 18), das in der Leber einer raschen und effektiven Umwandlung zu Glucose unterliegt (27, 9o). Es entstammt dem Glucoseabbau in Muskulatur und glykolysierenden Geweben (Erythrocyten, Nierenmark) und der im Vergleich zur Leber begrenzten Glykogenolyse, die im Verlaufe des Nahrungsentzugs auch das Muskelglykogendepot betrifft.

Im Gegensatz zu den Glykolysemetaboliten bilden die in dieser Situation ebenfalls vermehrt freigesetzten Aminosäuren (47) die Grundlage für eine "produktive" Gluconeogenese im Sinne einer Neusynthese aus Glucosevorläufern, die nicht dem Kohlenhydratbestand des Organismus entnommen sind.

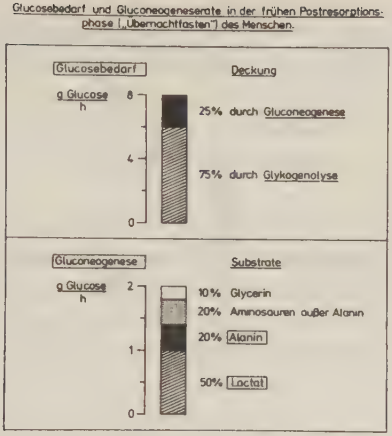


Abb.18: Glucosebedarf und Gluconeogeneserate in der frühen Postresorptionsphase ("Übernachtfasten") des Menschen (nach 34, 36, 68, 69, 31).

Auf die Sonderstellung des Alanins in diesem Prozess wurde bereits in der Einleitung eingegangen. Unter dem Aspekt der glykolyseabhängigen Synthese wäre die quantitativ wichtigste glucoplastische Aminosäure ein Substrat der "konservierenden" Gluconeogenese.Ob dieser Gesichtspunkt zutrifft, wird eine Frage der eigenen in-vitro-Untersuchungen sein.

Der Alaninanteil an der postabsorptiven hepatischen Glucoseproduktion des Menschen übertrifft den aller anderen Aminosäuren (siehe Abbildung 18) und wird mit etwa 2o % und mehr veranschlagt (68). Der Anteil an der Aminosäurengluconeogenese allein dürfte über 5o % ausmachen (32). Dieser Wert, der auch auf die Verhältnisse bei der Ratte übertragbar erscheint (32), könnte durchaus die Basis bilden für den Ersatz jener Glucosemoleküle, die auch im Hungerzustand durch Oxidations- oder andere Stoffwechselprozesse aus dem Kohlenhydrat-"Pool" des Körpers ausscheiden. Voraussetzung wäre jedoch, daß ein wesentlicher Anteil des Alaninkohlenstoffs in dieser Situation nicht dem Glucose-,

sondern dem Proteinvorrat des Organismus entstammen würde. Der Kohlenhydratkonservierung durch periphere Glucoseeinsparung und hepatische Lactatreutilisation stünde dann in der Alaninfreisetzung durch die Muskulatur das bestimmende Moment des endogenen Kohlenhydratersatzes bei fehlender exogener Glucosezufuhr gegenüber.

In der Einleitung der Arbeit wurde bereits auf die mögliche Bedeutung der Verschiebung des Insulin-Glucocorticoid-Verhältnisses im peripheren Blut für die Umschaltung des Muskelstoffwechsels nach Nahrungsentzug eingegangen. Die meisten der bisher dargestellten Befunde lassen sich mit dem Rückgang der Insulinwirkung erklären. Das betrifft sowohl den Glucosetransport in die Muskelfaser (18o-182) und die Glucoseutilisation auf der Stufe der Pyruvatdehydrogenase (183-188) als auch die Veränderungen der Proteinsynthese (189, 19o) und des Proteinabbaus (191, 192) im Hungerzustand. Für die anfangs erwähnte Hypothese, daß die gleichzeitige relative oder absolute (193) Hervorhebung der Glucocorticoidwirkung ursächlich bei diesen Prozessen mitwirkt, sprechen die im folgenden dargestellten Befunde nach Adrenalektomie und Glucocorticoidsubstitution.

2. Adrenalektomierte Ratten unter Basalbedingungen und nach Glucocorticoidsubstitution

Die Glucoseverfügbarkeit adrenalektomierter Ratten ist gegenüber Normaltieren sowohl bei Nahrungszufuhr ad libitum als auch nach Nahrungsentzug eingeschränkt (Abb.19). In beiden Fällen scheint der Unterschied Folge eines verminderten Substratangebotes, also vorwiegend quantitativer, nicht prinzipiell qualitativer Natur zu sein.
Die geringeren Leberglykogenwerte und niedrigeren Blutglucosespiegel unter Nahrungszufuhr können auf eine verminderte postoperative Nahrungsaufnahme zurückgeführt werden. Die Gewichtszunahme der Tiere ist verlangsamt,

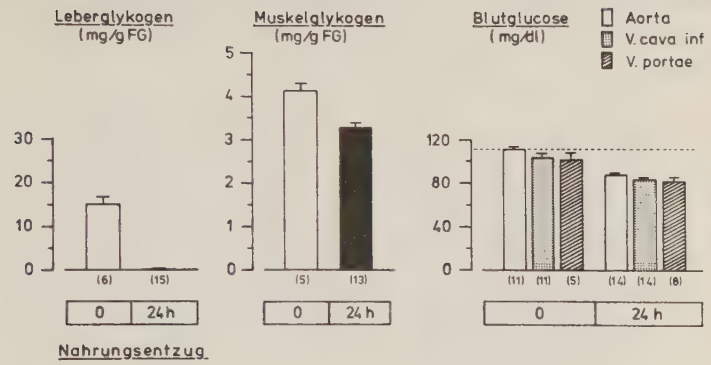


Abb.19: Glykogengehalt der Leber und des M.gastrocnemius und Glucosegehalt in Aorta, V.cava inf. und V.portae vor und nach 24-stündigem Nahrungsentzug bei adrenalektomierten Ratten. Mittelwerte und s_{EM}.
Die Glucosekonzentrationen im Schwanzvenenblut dieser Tiere liegen um 30 - 40 % niedriger als die hier angegebenen Werte. Zum Vergleich mit Normaltieren: siehe Abb.15.

ein Befund, der bei kontrollierter Fütterung nicht mehr zu erheben ist (194, 15). Der hormonelle Mangelzustand kann offenbar durch ein adäquates exogenes Substratangebot weitgehend kompensiert werden. Fehlt dieses Angebot nach einem 24-stündigen Nahrungsentzug, so wird der eigentliche Defekt innerhalb des Anpassungssyndroms manifest. Nach Entleerung des Leberglykogendepots sinken die Blutglucosekonzentrationen deutlich unter die Werte bei Normaltieren ab (Abb.19); hinzutretende Stressfaktoren, die mit erhöhtem Glucoseumsatz verbunden sind (beispielsweise Kälteexposition oder Arbeitsbelastungen), werden nur schwer toleriert und können zur letalen Hypoglykämie führen (195-197). Obwohl der homöostatische Regelmechanismus nicht aufgehoben ist, sind doch seine Effektivität und Belastbarkeit erheblich herabgesetzt (196).
Die Situation kennzeichnete D.J.INGLE im Jahre 1952 mit

einer Aussage, die auch heute noch unverändert Gültigkeit besitzt und das Problem (oder das Dilemma) der Untersuchungen von Glucocorticoideffekten charakterisiert:

> "In the normal resting animal the adrenal cortex functions quietly and gives no recognizable signs of its action. During adrenocortical insufficiency or excess, the changes from normal are ubiquitous; the functions and structure of most, if not all, tissues in the body are affected. No metabolic process is known to be abolished by adrenocortical insufficiency, and no new process is known to be created when these hormones are administered in excess. It is supposed that these and other hormones enter into body economy by affecting the rates of metabolic processes" (197).

Eine wesentliche Ursache für die im Hungerzustand veränderte Homöostaseregulation nach Ausschaltung der Glucocorticoidwirkung kann in der gestörten endogenen Substratbereitstellung für die Lebergluconeogenese gesehen werden. Besonders der verminderten Aminosäurenfreisetzung aus der Skelettmuskulatur kommt dabei wahrscheinlich eine Schlüsselfunktion zu (46, 198-2o4, 153). In welchem Umfang eine Einschränkung der hepatischen Gluconeogenesekapazität als weiterer Faktor wirksam wird, unterliegt noch der Diskussion (2o5-213, 39, 4o, 72, 74, 76). Die hohe Labilität der Glucosehomöostase adrenalektomierter Ratten, die nicht nur im Hungerzustand sondern auch unter besonderen Belastungsbedingungen am nicht-gehungerten Tier nachweisbar ist (214), stützt jedoch die zahlreichen Befunde, die für eine zusätzliche und direkte Beeinträchtigung von Glucosebereitstellung und -neubildung durch die Leber sprechen.

Homöostaseerhaltende Funktion der Glucocorticoide: koordinierte Wirkungen auf Gluconeogenese, extrahepatische Glucoseutilisation, Lipolyse und Aminosäurenverfügbarkeit aus der Skelettmuskulatur

Der Zustand der homöostatischen Dysregulation wird schon durch einmalige Glucocorticoidapplikation innerhalb kurzer

Zeit aufgehoben. Die Glucosekonzentration im Blut steigt auf Werte an, die mit denen am gehungerten Normaltier vergleichbar sind (Abb.2o).

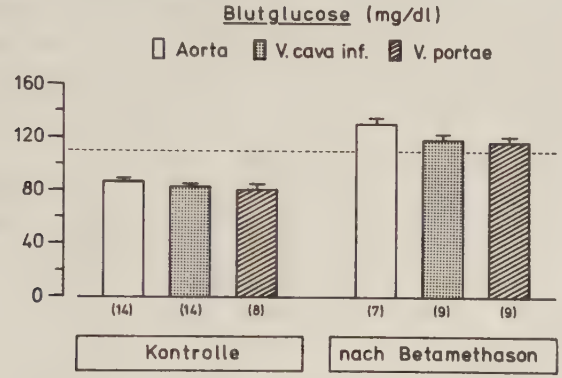


Abb.2o: Anstieg der Glucosekonzentration in Aorta, V.cava inf. und V.portae von 24 h-gehungerten, adrenalektomierten Ratten innerhalb 3-4 Stunden nach Betamethasoninjektion (5oo µg/1oo g KG i.p.). $\bar{x}$ und s_{EM}.

Als Ausdruck eines akuten Kohlenhydratüberschusses ist die erhebliche Glykogendeposition zu werten, die in der Leber, nicht jedoch im Muskelgewebe, gemessen werden kann (Abb.21).

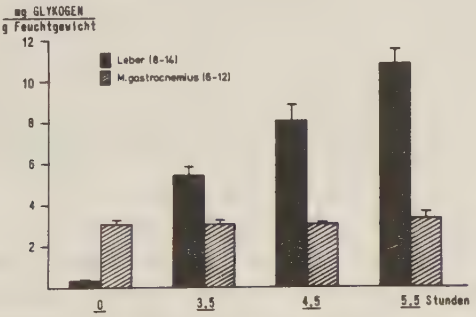


Abb.21: Glykogendeposition in der Leber und Glykogengehalt des M.gastrocnemius von 24 h-gehungerten, adrenalektomierten Ratten innerhalb der ersten Stunden nach einmaliger Betamethasoninjektion (5oo µg/1oo g KG i.p.). Mittelwerte und s_{EM} (n = 6-14).

Wie Untersuchungen unseres Institutes (215) und anderer Autoren (216, 217) zeigten, beginnen die dargestellten Veränderungen des Glucosestoffwechsels nach einer kurzen Latenzphase der Hormonwirkung. Für den Anstieg des Blutglucosespiegels beträgt sie 1 - 2 Stunden, für das Auftreten der Glykogensynthese in der Leber 2 - 3 Stunden (Abb.22).

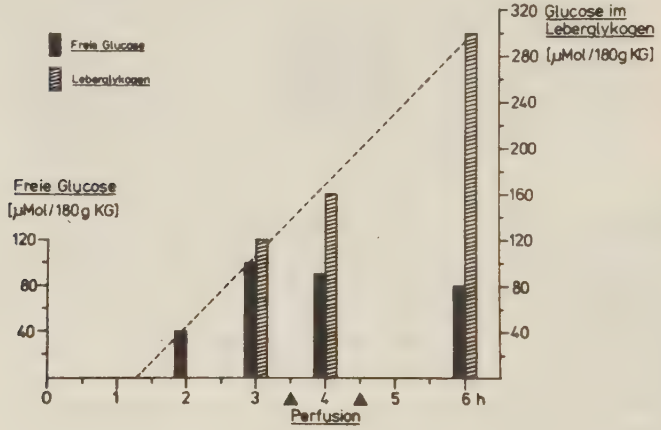


Abb.22: Zeitlicher Verlauf und Ausmaß der Bereitstellung freier und glykogengebundener Glucose im Körper einer 18o g schweren, adrenalektomierten Fastenratte nach einmaliger s.c.-Injektion von 1o mg Cortisol (nach 216). Während des Zeitraums der in-vitro-Experimente dieser Arbeit (Pfeile) nimmt in vivo nur noch der Leberglykogengehalt zu (gestrichelte Linie). Die Größenordnung der Zunahme kann daher als Bezugswert für die Abschätzung der quantitativen Bedeutung muskulärer Hormoneffekte herangezogen werden.

Formal erscheint die glucocorticoidbedingte Korrektur der Glucosehomöostase der adrenalektomierten Ratte als eine Wiederherstellung oder Aktivierung zuvor eingeschränkter normaler Adaptationsvorgänge an den Hungerzustand. Glykogenablagerung in der Leber und überschießender Glucoseanstieg im Blut können dabei im Sinne eines "Amplifikationseffektes" aufgrund der verwendeten hohen Hormondosis ge-

deutet werden.
Tatsächlich läßt sich die Mehrzahl der bisher bekannten Stoffwechselwirkungen der Glucocorticoide mit den weiter vorn beschriebenen Reaktionen auf akuten Nahrungsentzug korrelieren:
Als Basis der akuten Glucosebereitstellung wird die Durchsatzrate der Lebergluconeogenese erhöht (38o, 218-237, 4o, 39, 14, 15, 212, 213). Der gesteigerten Konversion zu Glucose unterliegen die Substrate, für die eine ausgeprägte Steigerung der extrahepatischen Freisetzungsrate im Hungerzustand bereits gezeigt wurde: Alanin (72, 76, 238), Lactat (239, 24o, 212, 213) und Pyruvat (227, 22o, 241). In den Prozess einbezogen ist auch Malat (239, 242), während die Glyceringluconeogenese offenbar weitgehend unbeeinflußt bleibt (239).
Gleichzeitig wird die Leberglykogenese stimuliert (616). Neben neugebildeter Glucose wird auch der Einbau exogen zugeführter, radioaktiv markierter Glucose in Glykogen innerhalb weniger Stunden nach Glucocorticoidapplikation gesteigert (24o). Übereinstimmend damit ist eine Interkonvertierung der Glykogen-Phosphorylase zur inaktiven und der Glykogen-Synthase zur aktiven Form festzustellen (243-248, 616), ein Vorgang, bei dem die Frage der gleichzeitigen Mitwirkung von Insulin noch offen ist (213, 247, 249-251, 2o).
Der "anabolen" Stoffwechsellage der Leber, die nicht nur den Glucose- und Glykogenaufbau, sondern auch den RNA- und Proteinumsatz betrifft (252, 253, 232, 599), ist ein beschleunigter Aminosäurentransport in die Zelle (254-257, 587) mit nahrungsabhängig unterschiedlichem Einfluß auf die intracelluläre Aminosäurenkonzentration zuzuordnen. Während unter Nahrungszufuhr ad libitum ein rascher Anstieg der freien Aminosäuren in der Leber erfolgt (258, 222), kommt es nach Nahrungsentzug zu einer Abnahme der intracellulären Konzentration der meisten Aminosäuren (258, 259). Der Befund eines gegenüber dem normalen

Hungerzustand erhöhten Alaningehaltes nach Glucocorticoidgabe (153, 259) konnte, wie später noch dargestellt wird, in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Auf die Bedeutung extrahepatischer Hormoneffekte für die beschriebenen Veränderungen des Leberstoffwechsels wurde schon in den ersten Übersichtsarbeiten zur Glucocorticoidwirkung hingewiesen (26o-263). Eigene Experimente mit der isoliert perfundierten Leber zeigten die essentielle Rolle eines optimierten Substratangebotes für die cortisolstimulierte Glykogensynthese (118, 2o4). Eine Erhöhung der Glucose- oder Aminosäurenkonzentration im Perfusat führte zu signifikant gesteigerten Glykogeneseraten; die Kombination beider Zusätze hatte einen additiven Effekt (Abb.23).

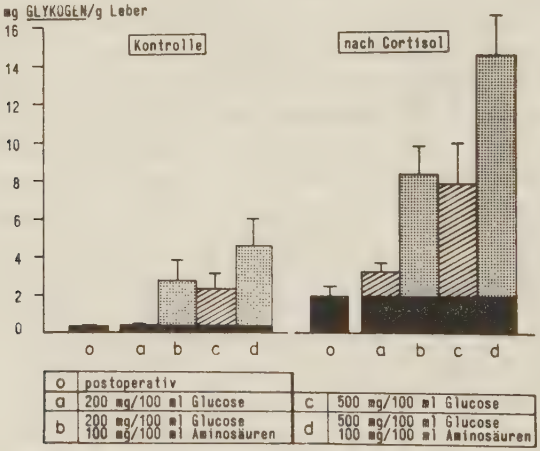


Abb.23: Glykogenese während 27o-minütiger Leberperfusionen ohne und mit 4-stündiger Cortisolvorbehandlung (5 mg/1oo g KG per os) der 24 h-gehungerten Spendertiere. Mittelwerte und s_{EM} (n = 4-6).

Qualitativ ähnliche Veränderungen des Substratflusses zur Leber sind aus der Analyse der bisher bekannten Glucocorticoidwirkungen auf verschiedene extrahepatische

Gewebe abzuleiten. Wie an der Leber, ergeben sich auch hier auffällige Parallelen zu den normalen Anpassungsvorgängen an den Hungerzustand, die vereinfachend und pauschal als "katabol" bezeichnet werden. Unter Glucocorticoideinfluß ist die Glucoseaufnahme und -oxidation zahlreicher Gewebe herabgesetzt; unter ihnen sind Haut- und Bindegewebe (237), Fettgewebe (16, 237, 264, 265) und lymphocytäres System (237, 266, 267) zu nennen. Die Bedeutung einer Glucoseutilisationshemmung in der Skelettmuskulatur als Bestandteil des hormonellen Wirkungskomplexes wird in den letzten Jahren zumeist skeptisch beurteilt oder verneint (268-27o, 233, 15). Ursachen dafür sind die weitgehend negativen Resultate am eviscerierten Tier (216, 271) und die Schwierigkeit, den wechselnden und diskreten positiven Befunden an speziellen Muskelpräparaten wie Herz und Diaphragma (272, 227, 27o,15) eine physiologische Signifikanz einzuräumen. Neuere Untersuchungen mit dem inkubierten Diaphragma (273) und dem M. soleus der Ratte (274) ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf eine verminderte Glucoseaufnahme. Ob die Skelettmuskulatur, in der wie in anderen Zielorganen Steroidrezeptoren nachzuweisen sind (275-279, 237, 617, 618), tatsächlich eine Ausnahme von dem offenbar allgemeinen Prinzip eines glucocorticoidinduzierten extrahepatischen Glucosesparmechanismus bildet, wird ein Aspekt der darzustellenden in-vitro-Untersuchungen sein.

Ein zweiter Glucocorticoideffekt mit Analogie zur Situation nach Nahrungsentzug betrifft die Lipolyse und am diabetischen Tier auch die Ketogenese (16, 264, 28o, 619). Möglicherweise ist dieser besonders im Insulinmangel und am in-vitro-Präparat nachzuweisende Effekt, der in enger "permissiver" Beziehung zu anderen adipokinetischen Hormonen steht, Bestandteil des vielschichtigen Regulationsvorganges in der Übergangsphase von Lipogenese zu Lipolyse. Nach bereits eingetretener Lipidmobilisation an der hungernden Ratte in vivo scheinen Glucocorticoide, wie frühere Untersuchungen unseres Institutes ergaben,

keinen zusätzlich steigernden Einfluß auf die Fettsäuren- und Glycerinkonzentration im Blut zu haben (281). Übereinstimmend damit wird auch der Acetyl-Coenzym A-Gehalt der Leber nicht erhöht (29o, 291). Eine indirekte, durch Lipolyseprodukte vermittelte Hormonwirkung auf Lebergluconeogenese (282-284, 25) und Glucoseutilisation der Skelettmuskulatur (285-289) ist aufgrund dieser Befunde weitgehend auszuschließen.

Wirkungen auf das Aminosäurenreservoir der Skelettmuskulatur

Der Anstieg der hepatischen Gluconeogenesekapazität nach Glucocorticoidapplikation ist verbunden mit einem Anstieg der Aminosäurenverfügbarkeit. Die erhöhte Einschleusung der Kohlenstoffskelette von Aminosäuren in den Intermediärstoffwechsel der Leber wird an der kurzfristig zunehmenden Stickstoffexkretion im Urin (26o, 216) oder der an nephrektomierten Ratten nach etwa drei Stunden einsetzenden Harnstoffakkumulation im Blut sichtbar (292). Obwohl eine frühzeitige, der "anabolen Phase" vorangehende Proteinsynthesehemmung auch in der Leber selbst einzutreten scheint (293-295), stehen quantitativ die Proteinreservoirs der extrahepatischen Gewebe als Substratquelle der Gluconeogenese im Vordergrund. Eine gesteigerte Proteinmobilisation durch Glucocorticoide wurde für die meisten dieser Gewebe nachgewiesen (237, 296) und ist als ein allgemeines Wirkungsprinzip dieser Hormone anzusehen. Bedeutsamstes Zielorgan ist die Skelettmuskulatur, deren spezifischer Proteinumsatz zwar deutlich geringer ist als in anderen Geweben (297), die aber aufgrund ihrer Quantität den höchsten Anteil an der täglichen Gesamtproteinsynthese- und -abbaurate des Körpers hat (297, 159, 3). Gleichzeitig ist, wie die kurzfristige und ausgeprägte Anpassung an den Hungerzustand zeigt (Abb.24), eine hohe Variationsmöglichkeit des Proteinumsatzes in der Skelettmuskulatur gegeben.

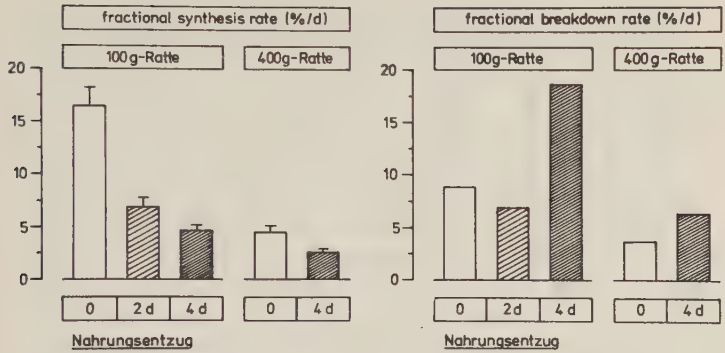


Abb.24: Anpassung von Proteinsynthese- und -abbauraten in Rattenmuskeln in vivo (M. gastrocnemius und M. quadriceps) an den Gluconeogenesebedarf im Hungerzustand. "Fractional rates": Prozentanteile des vorhandenen Muskelproteins, die pro Tag synthetisiert oder abgebaut werden (nach 298).
Die bei Hinterkörperperfusionen zu messende Syntheserate entspricht annähernd den in-vivo-Verhältnissen (299), während die Abbaurate in isolierten Systemen gegenüber in vivo erhöht zu sein scheint (3oo, 1oo).

Die Untersuchungen der letzten Jahre widerlegen damit die weit verbreitete Anschauung, daß die Muskelproteine aufgrund hoher Halbwertszeiten schwer mobilisierbar seien. Für den Gesamtproteinpool ist eine Halbwertszeit($t_{1/2}$) von etwa 6 (-1o) Tagen anzusetzen (158, 3o1). Dieser Durchschnittswert ergibt sich aus der relativ hohen Umsatzrate sarkoplasmatischer Proteine (vor allem Glykolyseenzyme) und der geringeren Rate der myofibrillären Strukturproteine (Tab.1o).

Interessanterweise kommt es, trotz der sehr unterschiedlichen Turnoverraten, im Hungerzustand (159) oder nach Glucocorticoidgabe (348, 331) zu einer weitgehend harmonischen Abnahme der Proteinfraktionen des Muskels. Die Aufrechterhaltung der relativen Proportionen zwischen Sarkoplasma- und Strukturproteinen kann als ein Schutzmechanismus betrachtet werden, der auch in ausgeprägt katabolen Situationen die Muskelfunktion sichert.

Muskelproteingehalt[a] (mg/gFG)		Halbwertszeit ($t_{1/2}$)[b]
Gesamtgehalt	190	
Myofibrillenproteine	115	7-20 (-30) Tage
Myosin	65	
Actin	25	
Tropomyosin	15	
Sarkoplasmaproteine	55	0.5-5 Tage
Glykolyseenzyme	40	
Creatinkinase	5	
Myoglobin	1	
Proteine subcellulärer Strukturen	10	
Kollagen und Elastin	10	

a) nach 302 b) nach 303-306, 301, 159

Tab.1o: Übersicht über das Proteinreservoir der Skelettmuskulatur und die Spannweite der durchschnittlichen Turnoverraten sarkoplasmatischer und myofibrillärer Proteine.
Die Halbwertszeiten für Synthese und Abbau variieren nach Alter, Ernährungszustand, Muskelfasertyp und Proteinspecies (zum Vergleich: nach (159) beträgt die Halbwertszeit der Leberproteine 1 - 1.5 Tage).

Experimentelle Hinweise auf eine glucocorticoidabhängige Proteinmobilisation in der Skelettmuskulatur

Die enge Beziehung zwischen erhöhter Glucosebereitstellung nach Glucocorticoidapplikation und Veränderungen des Proteinumsatzes in extrahepatischen Geweben wurde schon früh erkannt (26o, 262, 3o7). In-vitro-Untersuchungen an eviscerierten Ratten zeigten eine Verminderung der Aminostickstoff-Akkumulation im Plasma nach Adrenalektomie (3o8, 198) und einen entgegengesetzten Effekt nach Injektion von Cortison oder Cortisol (199, 3o9, 31o, 2o2). Ein direkter Nachweis der Glucocorticoidwirkung auf die Freisetzung verschiedener Aminosäuren durch ein isoliertes Muskelpräparat erfolgte 1975 in unserem Institut durch R. THIENHAUS und Mitarbeiter (46) (siehe Abbildung 2); die Befunde wurden kürzlich bestätigt durch die Arbeitsgruppe von J.H. EXTON (311).

Im Vergleich zu diesen in-vitro-Befunden sind am intakten Tier Veränderungen der Aminosäurenverfügbarkeit nach Adrenalektomie und Glucocorticoidsubstitution weit weniger deutlich nachweisbar und schwieriger zu interpretieren, da die bereits beschriebenen Änderungen der Aminosäurenutilisation durch die Leber und andere Organe das Bild entscheidend mitbestimmen (259). So wird nach einmaliger Cortisolgabe sowohl eine allgemeine leichte Zunahme (312-314) als auch eine Abnahme einzelner Aminosäuren beschrieben (259). Der Gehalt freier Aminosäuren im Muskel selbst wird nach Kurzzeitbehandlung erhöht (312, 313, 259), während nach längerer Applikationsdauer ein eher senkender Effekt auf die intra- und extracelluläre Aminosäurenkonzentration zu messen ist (313, 315).
Befunde unserer Arbeitsgruppe verdeutlichen die in-vivo-Situation (Abb.25+26). Trotz der zum Teil erheblichen Unterschiede in der Freisetzungsrate von Aminosäuren während der Passage des Rattenhinterkörpers, bleibt die Aminosäurenkonzentration im venösen Blut weitgehend konstant (Abb.25). Der Befund kann Ausdruck unterschiedlicher Utilisationsraten durch die Leber sein; die erhöhte hepatische Aminosäurenextraktion nach Glucocorticoidgabe (254-257, 587) führt zur Abnahme der arteriellen Konzentration, die während der Passage des Muskelgewebes wieder ausgeglichen wird. Besonders deutlich wird die Diskrepanz zwischen dem Glucocorticoideffekt auf die Aminosäurenabgabe aus der Muskulatur und dem Anstieg der Konzentration im Blut nach mehrtägiger Hormonsubstitution. Zu beachten sind die hohe Alaninfreisetzung zu diesem Zeitpunkt und die gesteigerte Abgabe der im Muskel nicht oder nur gering metabolisierbaren Aminosäuren Lysin, Arginin, Tyrosin und Phenylalanin (316) - ein Befund, der auf die Zunahme proteolytischer Vorgänge hinweist.
Mit Ausnahme der Untersuchungen nach mehrtägiger Glucocorticoidsubstitution, entsprechen die Unterschiede in den arterio-venösen Differenzen weitgehend den Veränderungen

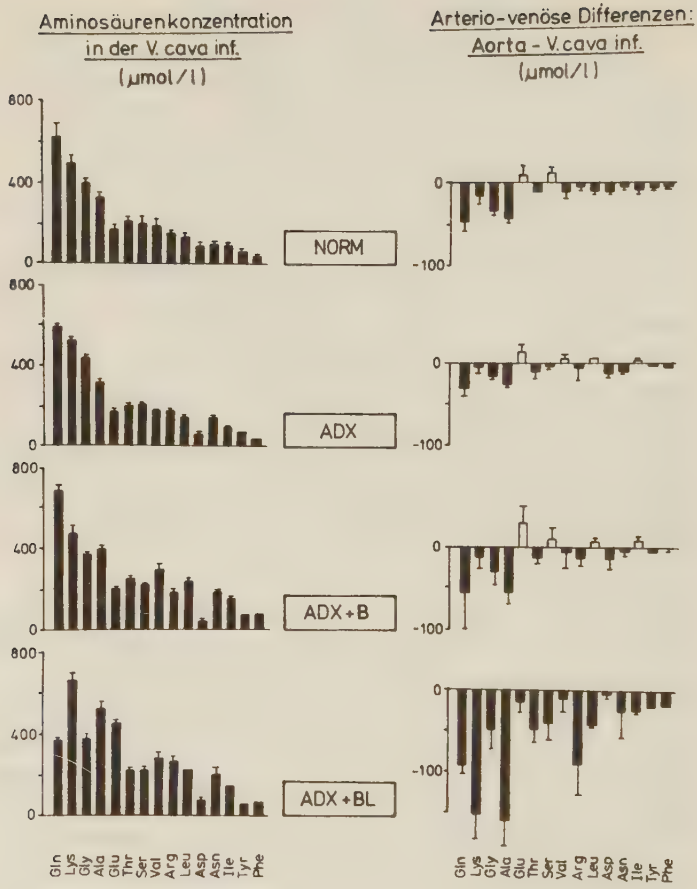


Abb.25: Aminosäurenkonzentration im Blut der V. cava inf. und arterio-venöse Differenzen nach Passage des Hinterkörpers 24 h-gehungerter normaler (NORM) und adrenalektomierter Ratten ohne(ADX) und mit Betamethason-substitution(ADX + B: 4 Stunden nach i.p. Injektion von 5 mg Betamethason/kg KG; ADX + BL: nach 5-tägiger Vorbehandlung mit 5 mg Betamethason/kg KG x d). Mittelwerte und s_{EM} aus 3 Analysen der Blutextrakte ("pools") von je 3 Tieren.

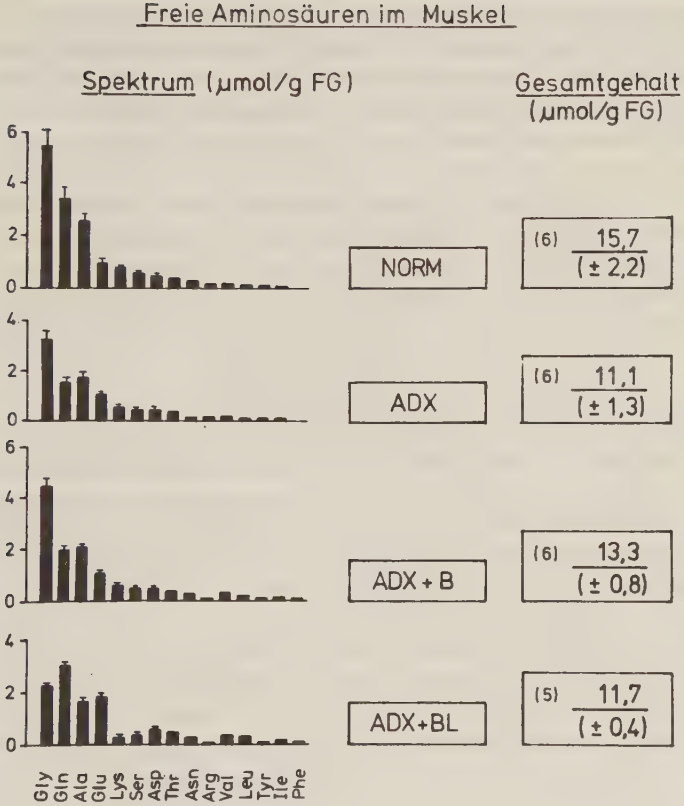


Abb.26: **In-vivo-Konzentrationsverhältnisse freier Aminosäuren im M. gastrocnemius 24 h-gehungerter normaler** (NORM) und adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit Betamethasonsubstitution (ADX + B: 4 Stunden nach i.p. Injektion von 5 mg Betamethason/kg KG; ADX + BL: nach 5-tägiger Vorbehandlung mit 5 mg/kg KG x d). Mittelwerte und s_{EM} (n=5-6).

des freien Aminosäurengehaltes im Muskel (Abb.26). Adrenalektomie führt zu einer signifikanten Abnahme der Aminosäurenkonzentration; besonders betroffen sind die Aminosäuren Glycin, Glutamin und Alanin. Einmalige Betamethasongabe ist von einer allgemeinen, jedoch nur für wenige Aminosäuren signifikanten Konzentrationszunahme gefolgt.
Nach mehrtägiger Substitution zeigen einige Aminosäuren einen Anstieg (Glutamin, Glutamat, Aspartat, Valin, Leucin und Isoleucin); die Konzentration der meisten anderen Aminosäuren, darunter Glycin und Alanin, wird dagegen vermindert. Die hohe Effluxrate dieser Aminosäuren, verbunden mit der intracellulären Konzentrationsabnahme, läßt auf eine grundlegende Veränderung der Transporteigenschaften der Muskelfasermembran in dieser Situation schließen.

Die Muskulatur als Reservoir freier Aminosäuren

Wie aus den intracellulären Konzentrationsverhältnissen bei Normaltieren (Abb.26) zu ersehen ist, werden verschiedene Aminosäuren (vor allem Glycin, Glutamin und Alanin) in hoher Konzentration in der Muskelfaser angereichert; für Glycin und Alanin beispielsweise liegt die Konzentration im Intracellulärwasser um einen Faktor 1o - 2o höher als in der Extracellulärflüssigkeit. Der Muskel enthält also neben den in Proteinen gebundenen Aminosäuren einen (häufig übersehenen) beträchtlichen Pool freier Aminosäuren, der durch Zu- oder Abnahme der extracellulären Konzentration (5o, 6o2), Modifikation von Transportprozessen oder Änderungen des intracellulären Proteinumsatzes reguliert werden kann und sehr rasch mobilisierbar ist. Die quantitative Bedeutung dieses Aminosäurenpools, der wahrscheinlich im Rahmen kurzfristiger Anpassungsvorgänge eine entscheidende Rolle spielt, geht daraus hervor, daß bei einer normalen 18o g Ratte rund 15o µmol freies Alanin in diesem Kompartiment, dagegen nur 1o - 2o µmol im Blut (Extracellulärraum) und rund 2o - 3o µmol in der Leber enthalten sind.

Die Auffüllung des Pools erfolgt, wie Untersuchungen von J.C. GAN und H. JEFFAY ergaben (317), im Futterzustand zu etwa 7o % aus extracellulären und im Muskel synthetisierten Aminosäuren und zu nur 3o % aus dem Proteinabbau. Mit Abnahme der extracellulären Aminosäurenverfügbarkeit nach Nahrungsentzug erhöht sich der Proteolyseanteil nach Angabe der Autoren auf etwa 65 %.

Mechanismen der Glucocorticoidwirkung auf die Proteinmobilisation in der Skelettmuskulatur

Über die subcellulären Mechanismen, die zur erhöhten Aminosäurenverfügbarkeit nach Glucocorticoidapplikation führen, ist bisher sehr wenig bekannt.
Die in der Literatur beschriebenen Befunde sprechen dafür, daß sowohl der Aminosäurentransport in die Muskelfaser als auch die Proteinsynthese und -degradation der Regulation durch Glucocorticoide unterliegen.

Hinweise auf eine Regulation des Aminosäurentransports

Die Aufnahme verschiedener natürlicher Aminosäuren, darunter Alanin, und der nicht-metabolisierbaren α-Aminoisobuttersäure (AIB) in die Muskulatur adrenalektomierter und normaler Ratten wird durch Glucocorticoide gehemmt (318-322, 257). Obwohl unsubstituierte adrenalektomierte Ratten gegenüber Normaltieren keine wesentliche Veränderung des muskulären Aminosäurentransports erkennen lassen (318), sind im in-vitro-Experiment sehr geringe Hormonkonzentrationen ($1o^{-7}$ mol/l) wirksam (321), so daß trotz des Fehlens von Ausfallserscheinungen von einer "physiologischen Glucocorticoidwirkung" gesprochen werden kann (es handelt sich im übrigen um den bisher einzigen Effekt auf die Muskulatur, der mit einer physiologischen Glucocorticoiddosis erzielt wurde). Die Hemmung der Aufnahmerate, die vergleichbar ist mit der bereits beschriebenen Situation im Hungerzustand (163), tritt mit einer Latenzzeit von 1 - 2 Stunden nach Hormonzusatz ein (321, 322). Als Ursache für die Verzögerung des Wirkungseintritts wird die Synthesehemmung einer am

Aminosäurentransport beteiligten Proteinkomponente diskutiert; sowohl Puromycin als auch Actinomycin D zeigen zeitlich und quantitativ eine ähnliche transportinhibierende Wirkung wie Glucocorticoide, und unter Anwesenheit dieser Substanzen ist kein zusätzlicher Hormoneffekt mehr feststellbar (322). Da die Halbwertszeit von Proteinen der Aminosäurentransportsysteme möglicherweise sehr kurz ist (323, 324), ließe sich über eine hormonelle Hemmung der Neusyntheserate die kurzfristige Veränderung der Transportkapazität erklären.
Wie jüngste Untersuchungen der Arbeitsgruppe von T.D. GELEHRTER an Hepatomzellkulturen (HTC-Zellen) zeigten, scheinen Glucocorticoide bevorzugt das A-Transportsystem ("alanine-preferring") zu hemmen, während das L-System ("leucine-preferring") weitgehend unbeeinflußt bleibt (325, 6o3). Im Gegensatz zur oben dargestellten Theorie scheint allerdings in Hepatomzellen der glucocorticoidbedingte Hemmeffekt an eine intakte Proteinsynthese gebunden zu sein. Hier lassen die Ergebnisse von Versuchen mit Cycloheximid und Actinomycin D vermuten, daß die Induktion eines transportinhibierenden Proteins oder die Bildung eines Proteinfaktors, der die Syntheserate von Komponenten des Transportsystems hemmt oder deren Abbaurate steigert, der Kontrolle durch Glucocorticoide unterliegt (325).

Hinweise auf eine Regulation der Proteinsynthese

Als Grundlage der gesteigerten Aminosäurenverfügbarkeit nach Glucocorticoidapplikation wird seit langem die Proteinsynthesehemmung in der Muskulatur diskutiert (2o1). Adrenalektomie erhöht und Cortisol- oder Cortisonsubstitution vermindert, unabhängig von der Wirkung auf den Aminosäurentransport (328, 329), den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren (Glycin, Histidin, Phenylalanin) in das isolierte Rattendiaphragma (326, 327, 328). Ein kurzfristiger und ausgeprägter Hemmeffekt ist aufgrund von Untersuchungen unseres Institutes (33o) und anderer Autoren (257) auch

auf den Leucineinbau in die quergestreifte Skelettmuskulatur nachzuweisen. Diese Ergebnisse, die zum Teil hinsichtlich der verwendeten Aminosäuren oder der fehlenden Erfassung intracellulärer spezifischer Aktivitäten eine gewisse Unsicherheit beinhalten, wurden durch weitere Untersuchungen in den letzten Jahren bestätigt (298, 331-335). Diese mit Hilfe des Tyrosin- oder Phenylalanineinbaus gewonnenen Daten sprechen dafür, daß unter Glucocorticoidsubstitution die Proteinsyntheserate der Skelettmuskulatur um 4o - 6o % reduziert wird. Der quantitative Effekt dieser Einschränkung läßt sich abschätzen, wenn man berücksichtigt, daß etwa 3o - 5o % der aus dem Proteinabbau anfallenden Aminosäuren für die Synthese reutilisiert werden (6o4). Über die Lokalisation des hormonellen Angriffspunktes innerhalb des Syntheseprozesses besteht absolute Unklarheit. Ob eine Abnahme der RNA- (336) oder DNA-Synthese (337) in kausaler Verbindung zu den Änderungen des Proteinumsatzes steht, kann bisher nicht schlüssig beantwortet werden. Etwa 8o % der Muskel-RNA ist ribosomaler Natur (3), und offenbar besteht zwischen RNA-Gehalt und Proteinsyntheserate der Muskulatur eine enge Korrelation (161, 162), so daß an eine Regulation auf dieser Ebene zu denken ist. Es findet sich jedoch, zumindest im Rahmen der kurzfristigen Hormoneffekte, keine wesentliche Änderung des RNA- und DNA-Gehaltes (33o, 334), der die zu diesem Zeitpunkt vorhandene Störung der Ribosomenfunktion erklären könnte.

Die Proteinsynthesehemmung manifestiert sich in einer schon wenige Stunden nach Glucocorticoidgabe einsetzenden verminderten Syntheseaktivität isolierter Muskelribosomen (336, 338-34o). Gleichzeitig kann eine Veränderung des Ribosomenprofils mit Abnahme der Polysomen und Zunahme der 4oS- und 6oS-Untereinheiten (Abb.27) festgestellt werden (341, 34o, 334). Nach mehrtägiger Behandlung ist zusätzlich eine Abnahme des RNA-Gehaltes um rund 2o - 3o % und eine (möglicherweise daraus resultierende) Verminderung der "Initiationsfaktoraktivität" (gemessen an der

$Met\text{-}tRNA_f^{Met}$ -Bindung durch den post-ribosomalen Überstand von Muskelhomogenaten) um rund 25 % - 35 % zu beobachten (334). Damit ergibt sich eine auffallende Parallelität zu Befunden, die im Hungerzustand (342) oder in fast-twitch-Muskeln der diabetischen Ratte (343) zu erheben sind.

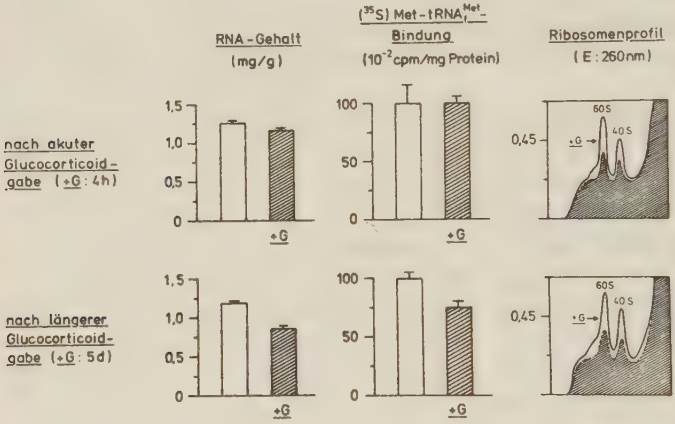


Abb.27: Änderungen des Ribosomenprofils, der "Initiationsfaktor-Aktivität" (Bindung von Initiator-tRNA durch "post-ribosomalen" Überstand) und des RNA-Gehaltes im M. psoas der Ratte 4 Stunden nach einmaliger (oben) oder nach fünftägiger Applikation (unten) von Dexamethason (1oo µg/g KG) (nach 334).

Die aus diesen aktuellen Untersuchungen mit allem Vorbehalt abzuleitende glucocorticoidabhängige Regulation des Initiationsvorganges der Proteinsynthese in der Muskulatur eröffnet interessante Perspektiven für die weitere Forschung.

Dabei wird sich zeigen, ob das typische Modell der Transkriptionskontrolle durch Glucocorticoide (237, 6o5, 6o6) auch bei der Proteinsynthesehemmung in der Muskulatur verwirklicht ist, oder ob der post-transcriptionellen

Regulation (6o7) in diesem Gewebe eine größere Bedeutung zukommt.

Hinweise auf eine Regulation des Proteinabbaus

Die Kennzeichnung der Glucocorticoide als "proteinkatabole" Substanzen und das damit verbundene Bild der Muskelatrophie und Steroidmyopathie (27o, 344-346) führte zu der allgemein verbreiteten Ansicht einer direkten Proteolysesteigerung durch diese Hormone. Lange Zeit hindurch wurde jedoch diese Annahme nur durch wenige experimentelle Daten gestützt (347, 2o1). Erst 1969 erbrachten Isotopenuntersuchungen von A.L. GOLDBERG konkretere Anhaltspunkte dafür, daß neben der Proteinsynthesehemmung eine Aktivierung des Proteolysesystems der Skelettmuskulatur dem Wirkungsspektrum der Glucocorticoide zuzuordnen ist (348, 349). Wie die Analyse des Proteinabbaus in unterschiedlichen Muskeln zeigte, sind von der Glucocorticoidwirkung besonders die phasischen Muskeltypen mit einem hohen Anteil an fast-twitch-glykolytischen Muskelfasern (weiße Typ 2-Muskeln) betroffen; tonische, slow-twitch-oxidative Fasertypen (rote Typ 1-Muskeln) scheinen dagegen durch einen bisher ungeklärten, möglicherweise mit dem Aktivitätsmuster und dem Spannungszustand dieser Muskeln zusammenhängenden Mechanismus (349, 351-353) weitgehend vor einer Atrophie geschützt zu sein, obwohl auch in diesen Muskeln glucocorticoidbedingte Änderungen von subcellulären Strukturen (35o) und Proteinumsatzraten beschrieben wurden (351, 335, 344). Ähnliche Verhältnisse eines selektiven Proteinabbaus in fast-twitch-glykolytischen Muskeln sind auch für die Situation im Hungerzustand (158) und im Diabetes mellitus (343) beschrieben worden. Teleologisch ist in diesem Zusammenhang interessant, daß die fast-twitch-glykolytische Faser, aufgrund ihrer bevorzugten Rekrutierung bei hohen Belastungsintensitäten (354, 355), möglicherweise als eine Art "Reservefaser" anzusehen ist, deren Rückgang in katabolen Zuständen keine schwerwiegende funktionelle Einbuße für den Organismus

bedeutet. Wie bereits erwähnt, scheint ein weiteres Schutzprinzip dadurch verwirklicht zu sein, daß der Proteinabbau ohne Bevorzugung einer bestimmten Komponente erfolgt; myofibrilläre und sarkoplasmatische Proteine sind in ähnlichem Umfang von Veränderungen des Proteinumsatzes betroffen (348, 331, 344, 159).

Mit der Weiterentwicklung von Isotopenmethoden wurde die Frage der Proteolyseaktivierung durch Glucocorticoide in den letzten Jahren erneut aufgegriffen. Die Arbeitsgruppe von A.L. GOLDBERG konnte zeigen, daß der normale Anstieg der Proteindegradation nach Nahrungsentzug an das Vorhandensein dieser Hormone gebunden ist (356, 357). Er fehlt bei adrenalektomierten Ratten und kann durch kurzfristige Cortisolsubstitution ausgelöst werden (358). Der Befund weicht jedoch von den Ergebnissen anderer Autoren ab, die mit einer vergleichbaren Methodik entweder keine Abbausteigerung durch Glucocorticoide nachweisen konnten (331, 333,335) oder der Regulation der Proteindegradation im Rahmen physiologischer Anpassungsmechanismen eine untergeordnete Bedeutung zumessen (298).
Während diese Kontroversen eine klare Aussage erschweren, sind weitere Hinweise auf eine glucocorticoidbedingte Proteolysesteigerung aus Untersuchungen abzuleiten, in denen die Ausscheidung von 3-Methylhistidin (N^{τ}-Methylhistidin) nach einmaliger (3o4) oder wiederholter Hormongabe (359, 36o) gemessen wurde.
3-Methylhistidin kann als relativ spezifischer Baustein der kontraktilen Proteine bezeichnet werden, da der überwiegende Teil der im Körper vorhandenen Menge in Myosin- und Actinmolekülen gebunden ist (361, 362); die Methylierung erfolgt nach dem Histidineinbau in die Peptidkette und eine Reutilisation nach proteolytischer Freisetzung scheint nicht einzutreten. Änderungen der Ausscheidung im Urin sind daher als ein empfindlicher Parameter des Myosin-Actin-Abbaus anzusehen (363, 364, 361).
Die Excretion des Aminosäurenderivates im Urin wird nach

Injektion von Glucocorticoiden signifikant gesteigert (3o4, 359, 36o). Der Effekt, der sowohl an der Ratte als auch beim Menschen (36o) nachzuweisen ist, scheint jedoch erst bei hohen Hormonkonzentrationen im Blut einzutreten (359). Die wirksame Konzentration bei Ratten (3o - 5o µg Corticosteron/dl) entspricht etwa den Werten, die physiologischerweise als Maximum im Circadianrhythmus (zu Beginn der Dunkelperiode nach einer 12-stündigen Lichtphase: 365) oder im Anschluß an die Einwirkung unterschiedlicher Stress-Faktoren zu messen sind (365-367). Über die Regulation, Lokalisation und molekularen Charakteristika der proteinabbauenden Systeme der Muskulatur ist bisher wenig bekannt. Während lysosomale Enzyme für die physiologische Proteolysesteuerung und im Rahmen der Glucocorticoidwirkung von untergeordneter Bedeutung zu sein scheinen (368, 3, 348, 236, 37o-372), haben in verschiedenen katabolen Zuständen myofibrilläre Proteinasen mit alkalischem Wirkungsoptimum zunehmendes Interesse gefunden (192, 278, 371, 373-375).
In Übereinstimmung mit den dargestellten positiven Befunden einer glucocorticoidbedingten Proteolysesteigerung und als möglichen Ausdruck des hormonellen Angriffspunktes konnten M. MAYER und Mitarbeiter eine Aktivitätssteigerung dieser Proteinasen nach mehrtägiger Triamcinolon- oder Cortisolbehandlung nachweisen (192, 278, 371). Adrenalektomie und 24-Stunden-Fasten hatten keine Auswirkung auf die Enzyme; mehrtägiger Nahrungsentzug und Alloxandiabetes dagegen führten zu einem beträchtlichen Anstieg der Proteinasenaktivität (192).
Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte unsere Arbeitsgruppe durch fünftägige hochdosierte Betamethasonbehandlung adrenalektomierter Ratten keinen signifikanten Anstieg der erwähnten Proteinasen auslösen, obwohl die starke Abnahme des Körpergewichts um 2o - 3o % gegenüber den Kontrolltieren und der erheblich gesteigerte Phenylalanin- und Tyrosinefflux aus der Hinterkörpermuskulatur auf eine erhöhte Proteolyserate hindeuteten (Tab.11).

	NORM	ADX	ADX+B	ADX+BL
Netto-Proteinabbau (%/h)	~0.17	~0.08	~ 0.13	-0.8
Aktivität alkalischer Proteinasen der Myofibrillen-Fraktion:				
Myofibrillen-Autolyse µg Tyrosin/mg Protein × h	5.9 (3) (±1.1)	4.9 (10) (±0.6)	5.4 (3) (±0.8)	7.4 (6) (± 1.7)
Azocasein-Proteolyse U/mg Protein	3.1 (3) (±0.4)	3.0 (10) (±0.3)	3.2 (3) (±0.5)	4.2 (6) (±0.5)
^{14}C-Hämoglobin-Proteolyse cpm × 10^{-3}/mg Protein × h	1.86 (6) (±0.23)	2.41 (12) (±0.31)	2.11 (10) (±0.15)	1.81 (5) (±0.13)

Tab. 11: Netto-Proteinabbau der Hinterkörpermuskulatur in vivo und Aktivitätszustand myofibrillärer Proteinasen im M. gastrocnemius 24 h-gehungerter normaler (NORM) und adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit Betamethasonsubstitution (ADX + B: 4 Stunden nach i.p.-Injektion von 5oo µg/1oo g KG; ADX + BL: nach 5-tägiger Substitution mit 5oo µg/1oo g KG x d). Der Netto-Proteinabbau wurde berechnet aus den Freisetzungsraten von Phenylalanin und Tyrosin unter Berücksichtigung ihrer Anteile im Muskelprotein. Die Methodik der Proteinasenbestimmung entsprach den Angaben in (373, 374, 192).

Die Ursache für das negative Ergebnis der enzymatischen Untersuchungen (gegenüber den im Tyrosin- und Phenylalanineffux deutlich werdenden Hinweisen auf eine gesteigerte Proteolyse) und die Diskrepanz zu den oben erwähnten Autoren ist bisher unklar. Eine wesentliche Abweichung der "katabolen Potenz" des Betamethasons von anderen Steroiden liegt nicht vor (339, 34o).
Aufgrund der vergleichbaren Methodik ist auch ein möglicherweise präparationsabhängig unterschiedliches Wirksamwerden von Proteaseninhibitoren im Testansatz weit-

gehend auszuschließen. Zu berücksichtigen ist, daß in den Analysenverfahren mit künstlichen Substraten (Azocasein, Hämoglobin) wahrscheinlich nicht die komplexe in-vivo-Situation erfaßt wird, in der hormonell bedingte Strukturänderungen der Proteinsubstrate eine Bedeutung für die Abbauregulation haben könnten (376). In jedem Fall bedarf es weiterer Untersuchungen, um den Prozess der glucocorticoidabhängigen Proteolyseregulation in der Skelettmuskulatur zu verstehen.

Synopsis der Befunde: Kombinierte Synthese- und Abbauregulation von Muskelproteinen durch Glucocorticoide

Als Voraussetzung für den schon kurze Zeit nach Glucocorticoidgabe einsetzenden, erhöhten Aminosäurenefflux aus der Skelettmuskulatur ist die Proteinsynthesehemmung anzusehen, durch welche die Wiederverwertung der aus dem Abbauprozess stammenden Aminosäuren eingeschränkt wird. In welchem Umfang eine Steigerung der Proteolyserate selbst wirksam wird, scheint von der Dauer und Intensität des Hormoneinflusses bestimmt zu werden.
Die Effektivität der Veränderung des Proteinturnovers wird dadurch erhöht, daß gleichzeitig eine Hemmung der Wiederaufnahme freigesetzter Aminosäuren in die Muskelfaser erfolgt. Wesentliches Prinzip der Glucocorticoidwirkung auf den extrahepatischen Aminosäurenumsatz ist daher die Einschränkung eines "Reutilisationszyklus", durch welche die Proteinakkumulation des Muskels vermindert und Aminosäurenkohlenstoff für die Lebergluconeogenese verfügbar gemacht wird.
Als Hinweis auf die physiologische Bedeutung dieser Wirkungen im Rahmen normaler Anpassungsvorgänge sind sowohl die Befunde am adrenalektomierten Tier (relative Zunahme der Proteinsynthese (326, 327) und fehlende Abbausteigerung (356) nach Nahrungsentzug) als auch die auffallende Parallelität zwischen den Veränderungen im Hungerzustand und der Situation nach einmaliger Cortisolinjektion bei

Ratten (Abb.28) zu werten.

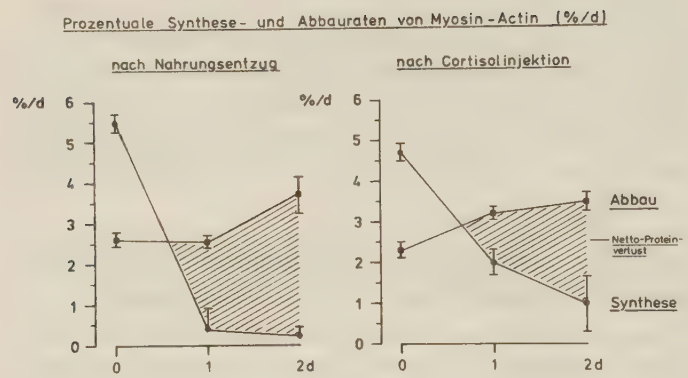


Abb.28: Kurzfristige Änderung von Synthese- und Abbauraten im Rattenmuskel als Reaktion auf Nahrungsentzug oder einmalige Cortisolinjektion (3 mg/1oo g KG) (nach 3o4)

Diese mit Hilfe der 3-Methylhistidin-Methodik (364) erhobenen Daten zeigen, daß durch die koordinierte Änderung der Proteinsynthese und -degradation innerhalb kurzer Zeit ein Netto-Proteinabbau von 3 - 4 %/d resultiert, ein Wert, der mit den eigenen Daten (siehe Tabelle 13) gut übereinstimmt.

Gesteigerte Alaninbereitstellung aus der Skelettmuskulatur als Leitsymptom der extrahepatischen Glucocorticoidwirkung

Obwohl in der Vergangenheit die wichtige Rolle des Alanins als Gluconeogenesevorläufer immer wieder hervorgehoben wurde (377, 76, 378, 67, 53, 54, 68, 174, 175, 379, 38o), ist in den bisher vorliegenden Publikationen zur Glucocorticoidwirkung auf die Skelettmuskulatur nur selten auf den besonderen quantitativen Stellenwert dieser Aminosäure eingegangen worden.
Die gegenüber anderen Aminosäuren bevorzugte Abgabe von Alanin im Hunger- (52, 174) und Diabeteszustand (46, 52)

scheint auch für die Situation nach Glucocorticoidapplikation zuzutreffen. So beschreiben I.E. KARL und Mitarbeiter nach dreitägiger Cortisonbehandlung von Ratten einen gegenüber Glutamin und Glutamat sehr ausgeprägten Anstieg des Alanineffluxes aus einem isolierten Muskelpräparat (52), ein Befund, der mit den eigenen bereits dargestellten in-vivo-Ergebnissen (siehe Abbildung 25: ADX + BL) übereinstimmt.

Analog zu diesen Ergebnissen ist bei der adrenalektomierten Ratte ein starker Rückgang der Alaninfreisetzung aus der Muskulatur in vivo (381) und während isolierter Hinterkörperperfusionen zu messen (46, 333, 311). Durch Glucocorticoidvorbehandlung der Tiere wird dieser Mangel ausgeglichen; dabei hebt sich die Zunahme der Alaninfreisetzung von den übrigen Aminosäuren deutlich ab (Abb.29). Einen quantitativ bemerkenswerten Anstieg zeigen auch die Aminosäuren Glutamin, Glycin und Serin, deren physiologische Bedeutung als Substrate für die Lebergluconeogenese (26, 62) in vivo wahrscheinlich geringer ist, als es frühere Befunde an der isolierten Leber (27) vermuten lassen.

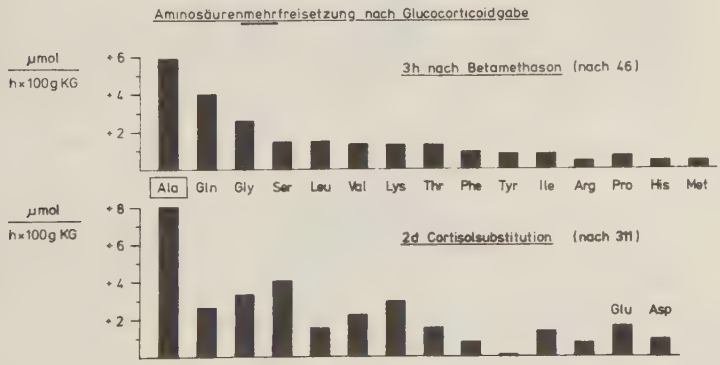


Abb.29: Mittlerer Anstieg der Aminosäurenfreisetzung aus der Skelettmuskulatur nach Glucocorticoidinjektion bei gehungerten adrenalektomierten Ratten (nach 46 u. 311).

Zu berücksichtigen ist in diesem Zusammenhang, daß Glutamin auf indirektem Wege die hepatische Gluconeogeneserate entscheidend beeinflussen kann; durch Aufnahme und Metabolisierung der Aminosäure in der Dünndarmmucosa wird die Alaninsynthese und -freisetzung durch dieses Gewebe stimuliert (69, 31, 32, 382, 383, 628). Die der Leber zufließende Alaninmenge soll auf diesem Wege um rund 5o - 1oo % erhöht werden (32, 69).
Ein weiteres Organ mit bevorzugter Glutaminextraktion (und geringer Alanin- (62) und hoher Serinfreisetzung) ist die Nierenrinde, in der die Aminosäure als NH_3 -Lieferant für die Säurenneutralisation und Hauptsubstrat der unter Acidosebedingungen und im prolongierten Fastenzustand relevant werdenden Gluconeogenese dient (384-387). Der experimentelle Nachweis eines fördernden Glucocorticoideinflusses auf die glutaminabhängige Alaninsynthese in Darm und Niere steht, soweit überschaubar, bisher aus.

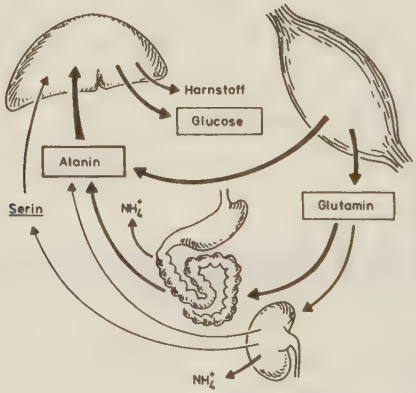


Abb.3o: Alaninfluß zur Leber als Grundlage der Aminosäurengluconeogenese.

Aufgrund der dargestellten Verhältnisse kommt der Modulation der Alanin- und Glutaminfreisetzung aus der Muskulatur ein erheblicher Stellenwert innerhalb des Wirkungskomplexes

der Glucocorticoide zu. Das gilt besonders für die Gluconeogeneseregulation, da unter normalen Bedingungen nicht so sehr die enzymatische Kapazität, sondern vielmehr das Vorläuferangebot die limitierende Größe der Glucoseneubildungsrate in der Leber ist (67). Dieser Umstand geht auch aus eigenen in-vivo-Untersuchungen hervor, die zeigen, daß 4 Stunden nach Betamethasoninjektion an hungernden Ratten kein Anstieg der intrahepatischen Alaninkonzentration im Sinne einer Substratsättigung zu messen ist (Abb.31). Der Konzentrationsabfall spricht vielmehr für einen glucocorticoidbedingten intrahepatischen "Substratsog" (zugleich ein Hinweis auf die direkte Leberwirkung der Hormone), dessen Effektivität gebunden ist an den Präcursorzustrom aus den extrahepatischen Geweben.

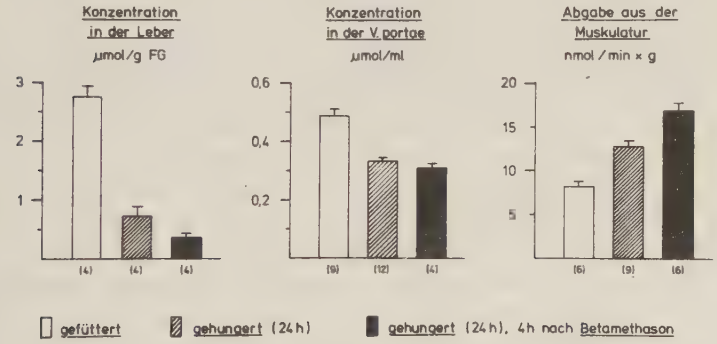


Abb.31: Veränderung der intrahepatischen Alaninutilisation und der extrahepatischen Alaninfreisetzung als Reaktion auf 24 h-Nahrungsentzug und Glucocorticoidinjektion bei normalen Ratten (18o-24o g KG). Mittelwerte und s_{EM}.

Die für die Ratte beschriebenen Veränderungen der muskulären Aminosäurenfreisetzung scheinen auch auf die Situation des Menschen zuzutreffen. Klinische Untersuchungen ergaben, daß nach mehrtägiger Dexamethasonapplikation (2 - 8 mg/d)

der Alaningehalt des Plasmas besonders prägnant ansteigt und mit der erhöhten Harnstoffexkretion im Urin korreliert (75, 388). In Übereinstimmung mit den tierexperimentellen Befunden war ebenfalls eine Glutaminzunahme zu messen (388), während die meisten übrigen Aminosäuren nur unbedeutende oder keine Änderungen zeigten (75). Der Glucosegehalt des Plasmas blieb unverändert (388) oder wurde um rund 2o % erhöht (75); in beiden Untersuchungen kam es zu einer signifikanten Steigerung der Insulin- und Glucagonkonzentration im Plasma (auf die mögliche kausale Verknüpfung von Alaninanstieg und Glucagonsekretion wurde bereits in der Einleitung hingewiesen).

Als Hinweis auf die "physiologische Natur" der durch Dexamethason ausgelösten Veränderungen ist zu werten, daß qualitativ und quantitativ vergleichbare Befunde auch bei Patienten mit CUSHING-Syndrom zu erheben sind (75).

Einen interessanten Gegensatz zu den besprochenen Untersuchungen bildet eine Studie zur Glucocorticoidwirkung im Langzeitfasten (35-tägiger totaler Nahrungsentzug). Bei den ausgeprägt ketonämischen Probanden führte Cortisonacetat zu keinem Anstieg der α-Aminostickstoffkonzentration im Serum, während Blutglucose und Seruminsulin eine signifikante Zunahme zeigten (389). Die bei einem Probanden durchgeführte Analyse des Aminosäurenspektrums während einer 72 h-Cortisolinfusion ergab, daß der sehr niedrige Ausgangswert der Alaninkonzentration unter der Infusion nicht wesentlich verändert wurde. Die Autoren diskutieren eine Aufhebung der "katabolen" Glucocorticoidwirkung durch den begleitenden Insulinanstieg; der Vergleich mit den beiden anderen Untersuchungsreihen, bei denen trotz einer Insulinzunahme signifikante Änderungen der Aminosäurenkonzentration zu messen waren, legt jedoch die Vermutung nahe, daß andere Faktoren die Glucocorticoidwirkung in der bereits bestehenden katabolen Stoffwechsellage modifizierten. Möglicherweise kommt dabei den Ketonkörpern (88, 89, 39o, 6o9) oder auch Veränderungen des intramuskulären Redoxstatus (391, 392) eine entscheidende Regulatorfunktion zu. Experimentelle Daten zu diesem Problem stehen noch aus.

Glucocorticoid-Insulin-Interaktionen an der Skelettmuskulatur

Zahlreiche der dargestellten Glucocorticoideffekte erscheinen als "Antagonismus" zu den bekannten Stoffwechselwirkungen des Insulins. Als ein typisches Beispiel kann der gegensätzliche Einfluß beider Hormone auf die Ribosomenaggregation und Proteinsynthese der Muskulatur angeführt werden: während Glucocorticoidgabe an Ratten eine Disaggregation der Muskelribosomen (siehe Abbildung 27) auslöst, führt Insulin während 3-stündiger Hinterkörperperfusionen (19o, 99) zu einer deutlichen Abnahme der Ribosomenuntereinheiten und Zunahme der Polysomen (Abb.32). Ob eine gegenseitige Aufhebung oder Einschränkung der Hormoneffekte auf der Grundlage gemeinsamer subcellulärer Angriffspunkte erfolgt, kann bisher nicht entschieden werden. Das gilt auch für konträre Wirkungen auf die Glucoseutilisation und den Aminosäurenstoffwechsel, die in der Vergangenheit zur Einordnung der Glucocorticoide in die Reihe der "physiologischen Insulinantagonisten" führten (61o).

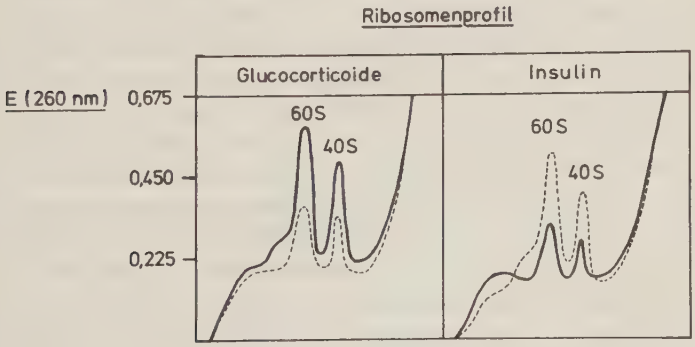


Abb.32: "Antagonistische" Regulation der Ribosomenaggregation in der Skelettmuskulatur der Ratte durch Glucocorticoide und Insulin (nach 334 u. 19o).

Hinweise auf "insulinantagonistische" Effekte der Glucocorticoide auf die Glucoseutilisation der Skelettmuskulatur

Als Ausdruck einer antagonistischen Wechselwirkung zwischen Glucocorticoiden und Insulin wurden schon früh die Befunde einer gesteigerten Insulinsensitivität (393-396) und einer Abschwächung der diabetischen Hyperglykämie und Glucosurie (26o, 397) nach Ausschaltung der Nebennieren gewertet. Die Umkehrung dieser Effekte durch Verabreichung von Nebennierenrindenhormonen (26o, 393, 398-4oo) und die Auslösung diabetesähnlicher Symptome, wie Hyperglykämie, Glucosurie und erhöhte Stickstoffausscheidung im Urin (4o1, 4o2), führten zu den Begriffen der "Anti-Insulin-Wirkung" und des "Steroiddiabetes" (4o2, 4o3). Im Gegensatz zum Insulinmangeldiabetes erwies sich besonders der am Stickstoffverlust erkennbare Proteinkatabolismus als weitgehend insulinresistent (4o2-4o4). Hinsichtlich der Veränderungen des Glucosestoffwechsels scheinen Ausprägung und Intensität des "Steroiddiabetes" speciesabhängig zu sein; während verschiedene Versuchstiere (Meerschweinchen, Kaninchen, Schafe, Hamster, Mäuse) auf Glucocorticoidapplikation ähnlich wie Ratten reagieren, wurde für den Hund ein erhöhter Glucoseturnover mit Ausbleiben der typischen Hyperglykämie beschrieben (4o5-4o8). In welchem Umfang diese Befunde auf den Menschen übertragbar sind, ist umstritten (zur Übersicht: 4o6, 611). Wie die weiter oben erwähnten Untersuchungen der letzten Jahre (75, 388, 389), die Symptomatik des CUSHING-Syndroms (4o9) und verschiedene publizierte Fälle eines iatrogenen "Steroiddiabetes" (41o-412) zeigen, sind jedoch wesentliche Äquivalente der an Ratten gewonnenen Ergebnisse auch beim Menschen zu finden.

Als Grundlage der Hyperglykämie und Glucosurie im Erscheinungsbild des "Steroiddiabetes" wurde sowohl die Überproduktion von Glucose durch die Leber als auch die Utilisationshemmung in der Skelettmuskulatur diskutiert. Versuche, die in-vivo-Befunde mit einer veränderten Glucoseaufnahme und Insulinsensitivität isolierter Muskelpräparate

zu korrelieren, waren jedoch bisher wenig erfolgreich (zur Übersicht: 227, 268).

Aus Untersuchungen mit positivem Ergebnis, die am isolierten Rattendiaphragma (326, 413-416) oder perfundierten Rattenherzen (417-419) durchgeführt wurden, lassen sich folgende Gesichtspunkte ableiten:

a) die basale Glucoseaufnahme der Diaphragmamuskulatur wird durch Adrenalektomie und Glucocorticoidapplikation nur geringfügig verändert (326); ein ausgeprägter Hemmeffekt ist nach mehrtägiger Cortisolvorbehandlung unter Zusatz submaximaler Insulindosen zum Inkubationsmedium zu beobachten (326, 416);

b) die insulinstimulierte Glucoseutilisation der isoliert perfundierten Herzmuskulatur diabetischer Ratten wird durch Adrenalektomie oder Hypophysektomie erhöht und durch Cortisolvorbehandlung vermindert (417, 418).

In der Mehrzahl der vorliegenden Untersuchungen wird der inhibierende Glucocorticoideffekt, in Übereinstimmung mit der Manifestation in Situationen des erhöhten Glucosetransports, auf eine erniedrigte Phosphorylierungsrate (414, 418, 419) zurückgeführt. Ob diesem Mechanismus jedoch unter Normalbedingungen eine entscheidende regulative Bedeutung zukommt, ist schwer zu sagen. Die Kapazität der Glucosephosphorylierung in der Muskulatur ist sehr hoch (Werte bis zu 4 μmol x min^{-1} x g^{-1} (42o) werden angegeben, die apparente Phosphorylierungsrate in vivo dürfte jedoch erheblich geringer sein), so daß erst nach erheblicher Aktivierung des limitierenden Membrantransportes der Hexokinasereaktion eine Regulatorfunktion zukommt (421). In diesem Fall führt die Hemmung der Hexokinasereaktion zu einer Akkumulation freier Glucose im Sarkoplasma, die, bedingt durch das Phänomen des Gegentransportes (182), die Netto-Aufnahme von Glucose zunehmend ineffizienter werden läßt. Darüberhinaus lassen die beschriebenen Experimente keine Differenzierung zu, ob es sich bei

den beobachteten Glucocorticoidwirkungen um Primäreffekte oder um Auswirkungen einer veränderten Stoffwechsellage der untersuchten Tiere handelt. Erhöhte Fettsäuren- und Ketonkörper-Konzentrationen im Plasma (16, 422, 423) könnten für die Hemmung der Glucosephosphorylierung in Herzmuskel- und Diaphragmapräparaten verantwortlich sein (285, 424). Dafür spricht, daß Insulinvorbehandlung der Spendertiere von nur wenigen Stunden Dauer den Phosphorylierungsdefekt aufhebt (419).

Eine bisher nicht näher geklärte Interaktionsebene von Glucocorticoiden und Insulin mit Rückwirkung auf die Phosphorylierungskapazität könnte die Syntheseregulation der Hexokinase sein. In Muskeln streptozotocin-diabetischer Ratten ist die Totalaktivität der Hexokinase (Typ II, K_M 0.2 mmol/l) um 3o - 4o % vermindert; nach Insulininjektion wird sie innerhalb kurzer Zeit wiederhergestellt (425). In Analogie dazu wird nach einmaliger Dexamethasonapplikation eine Abnahme der Hexokinase II-Aktivität im Fettgewebe um 25 % beschrieben (426); möglicherweise trifft dieser Befund auch auf die Muskulatur zu (427, 428), in der während einer Glucocorticoidlangzeittherapie eine zum Teil erhebliche Aktivitätsabnahme der meisten Glykolyseenzyme gemessen wurde (429).

Gegenüber diesen Hinweisen auf eine indirekte Beeinflussung der muskulären Glucoseaufnahme durch Glucocorticoide und Insulin, gibt bisher nur eine Arbeit einen Anhaltspunkt für die glucocorticoidabhängige Hemmung der Insulinwirkung auf den Membrantransport (416). Der Befund konnte jedoch in einer neueren Untersuchung mit dem inkubierten M. soleus der Ratte nicht bestätigt werden; erst bei sehr hoher Steroidkonzentration im Inkubationsmedium ($1o^{-2}$ mol/l), bei der "unspezifische" Effekte auf die Membranstruktur nicht auszuschließen sind (265), wurde eine signifikante Inhibierung des Glucosetransports gemessen (274).

Diese Diskrepanzen und weitere negative oder als negativ interpretierte Resultate am Ganztier (217, 43o), an der

eviscerierten Ratte (271) und am Diaphragma (273) lassen ein abschließendes Urteil darüber, welchen Stellenwert die Einschränkung der Glucoseutilisation und Insulinsensitivität der Skelettmuskulatur im Wirkungskomplex der Glucocorticoide einnimmt, bisher nicht zu.

Hinweise auf "glucocorticoidantagonistische" Effekte des Insulins auf die Aminosäurenaufnahme der Skelettmuskulatur

In Übereinstimmung mit den gegenläufigen Effekten auf die Proteinsynthese (siehe Abbildung 32) und den Proteinabbau (374, 375), wirken Glucocorticoide und Insulin auch auf den Aminosäurentransport der Skelettmuskulatur in entgegengesetzter Weise (318-322, 257, 431-434, 6o8, 189). Gemeinsamer Angriffspunkt scheint das A-System ("alanine-preferring") des Aminosäurentransports zu sein (325, 6o3, 435-438, 612). Ob dabei eine Interferenz zwischen aktivierender Insulin- und inhibierender Glucocorticoidwirkung besteht, ist experimentell ungeklärt. Einen indirekten Hinweis auf die gleichzeitige Ausprägung beider Hormoneffekte geben in-vivo-Untersuchungen, in denen Ratten vor einer Cortisoninjektion Glucose verabreicht wurde; in diesen Versuchen blieb der glucocorticoidbedingte Hemmeffekt auf die α-Aminoisobuttersäureaufnahme in die Muskulatur erhalten, obwohl die basale Aufnahmerate insgesamt gesteigert und der Leucineinbau in Muskelprotein normalisiert wurde (257). Von der direkten hormonellen Transportregulation sind, entsprechend der bevorzugten Wirkung auf das A-System, wahrscheinlich nur wenige Aminosäuren betroffen (435, 436, 612). Im Gegensatz dazu ist im Insulinmangel und nach Insulinapplikation (oder nach Adrenalektomie und Glucocorticoidgabe) die Freisetzung fast aller Aminosäuren aus der Muskulatur verändert (46, 99, 311), darunter Aminosäuren, deren Transport nicht über das A-System verläuft; neben den spezifischen Effekten auf den Einwärtstransport, scheinen daher die Hormonwirkungen auf den Protein- und Aminosäurenumsatz (mit entsprechenden Änderungen der

intra- und extracellulären Aminosäurenkonzentration) und den Effluxprozess selbst die aktuelle Freisetzungsrate entscheidend mitzubestimmen. Im übrigen ist die hormonelle Influx-Efflux-Regulation und die Substratabhängigkeit des Aminosäurentransports ein bisher wenig gelöstes Problem (439-443).

Von besonderem Interesse für die kurzfristige Gluconeogeneseregulation ist die Frage der Modulation des Alanintransports durch Insulin. Die ausgeprägten Änderungen der Freisetzungsrate in Abhängigkeit von der Nahrungszufuhr (174, 175) legen eine insulinabhängige Regulation nahe; sie ist jedoch aufgrund voneinander abweichender experimenteller Daten umstritten.
Verschiedene in-vitro-Untersuchungen mit dem isolierten Rattenhinterkörper ergaben eine geringe (81) oder deutliche Hemmung (46, 444, 445) der Alaninfreisetzung unter Insulinzusatz zum Perfusionsmedium; in anderen Experimenten war ein Effekt nur bei hohen basalen Freisetzungsraten (47, 185) oder erst nach längerer Perfusionsdauer (99) zu messen. Untersuchungen an einem inkubierten Muskelpräparat ließen keinen Insulineinfluß auf die Alaninabgabe erkennen (52); ebenso führten Insulininfusionen beim Menschen nicht zu einer Senkung der Alaninfreisetzung aus der Unterarmmuskulatur (63). Transportstudien am isolierten Rattendiaphragma schließlich ergaben, daß die Alaninaufnahme überwiegend insulinunabhängig erfolgt und nur ein geringer Anteil von 1o - 2o % über einen insulinsensitiven Mechanismus in die Muskelfaser transportiert wird (437). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Netto-Aufnahme in vivo, wie oben erwähnt, wahrscheinlich nicht nur von der direkten Hormonwirkung auf Transportsysteme, sondern auch von einer Reihe hormoneller Sekundäreffekte geprägt ist.
Insgesamt erlauben die vorliegenden Ergebnisse bisher nicht, die Hemmung der Alaninfreisetzung aus der Skelettmuskulatur als ein Wirkungsprinzip des Insulins darzustellen.

Beziehungen zwischen Glucocorticoidwirkung, Insulinsekretion und Insulin-Receptor-Bindung

Auf die enge funktionelle Verknüpfung zwischen katabolem und anabolem Regulationssystem und die mögliche subcelluläre Lokalisation einer Insulinresistenz weisen Veränderungen der Insulinsekretion und -bindung als Folge eines Glucocorticoidmangels oder -überschusses hin.
Adrenalektomie führt zu erniedrigten Insulinkonzentrationen im Blut gefütterter (446, 359) und gehungerter Ratten (447, 281). Glucocorticoidapplikation bewirkt demgegenüber einen Insulinanstieg im Blut, der schon in den ersten Stunden nach Hormongabe erkennbar wird (448, 215, 281) und nach mehrtägiger Substitution sowohl bei Versuchstieren (449-451, 273, 359, 446, 15) als auch beim Menschen (452, 613, 388, 389, 75) deutlich ausgeprägt ist.
Das veränderte Sekretionsverhalten korreliert nur bedingt mit entsprechenden Änderungen der Blutglucosekonzentration und kann häufig auch unabhängig davon beobachtet werden (453, 454, 449, 273, 388). Für eine veränderte Reaktivität des insulinsezernierenden Apparates sprechen Befunde, nach denen die glucoseinduzierte Insulinausschüttung des isolierten Pankreas adrenalektomierter Ratten herabgesetzt ist (447, 455) und durch mehrtägige Cortisolsubstitution wiederhergestellt und über das Normalmaß hinaus gesteigert wird (455, 456). Glucocorticoide sind offenbar erforderlich, um eine "normale" Insulinsekretion der B-Zellen zu gewährleisten. Die mit der Zu- oder Abnahme der katabolen Ausgangslage erfolgende Änderung der Insulinkonzentration im Blut kann vordergründig als Kompensationsmechanismus gegenüber einer auf zellulärer Ebene sich manifestierenden Änderung der Insulinsensitivität angesehen werden.
Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, daß längerfristige Glucocorticoidbehandlung zu einer verminderten Insulinbindung an Lebermembranen, Adipocyten und Hepatocyten führt (457, 458); sie wurde sowohl auf eine verminderte Receptorzahl als auch auf eine herabgesetzte

Bindungsaffinität zurückgeführt (458).
In Analogie dazu ergaben Experimente mit Fettzellen adrenalektomierter Ratten eine Steigerung der Bindungsaffinität (459) und -kapazität (446), die durch Cortisolsubstitution rückgängig gemacht wurde (446). Ob diese Veränderungen auf der Receptorebene primär mit den beschriebenen Änderungen der Insulinsekretion zusammenhängen ("up-regulation" der Receptorzahl bei niedriger und "down-regulation" bei erhöhter Insulinkonzentration) oder einen autonomen Glucocorticoideffekt darstellen, ist bisher nicht sicher zu beurteilen. In-vitro-Befunde am menschlichen Fettgewebe (46o) und die durch Insulinsubstitution nicht aufzuhebende Affinitätserhöhung beim adrenalektomierten Tier (446) weisen jedoch darauf hin, daß Glucocorticoide den Insulinreceptorbesatz von Zellmembranen beeinflussen können. Unbekannt ist bisher, ob die an Hepatocyten und Adipocyten erhobenen Daten auch auf die Skelettmuskulatur übertragbar sind. Die sich während eines 48-stündigen Fastenzustands einstellende Steigerung der Insulinsensitivität perfundierter Hinterkörpermuskulatur oder inkubierter Muskelpräparate (461-463), die mit der Situation im Diabeteszustand übereinzustimmen scheint (462), spricht für eine dominierende Rolle des Insulins bei der Receptorregulation im Rahmen physiologischer Anpassungsvorgänge.

Beziehungen der Glucocorticoide zur Glucagonsekretion

Neben der direkten oder indirekten Wirkung auf die Insulinsekretion ist nach Glucocorticoidgabe auch ein Anstieg der Glucagonkonzentration im Blut beschrieben worden (75, 388, 464, 174). Möglicherweise führt er im Rahmen der Gluconeogenese und Lipolyseregulation zu einer Verstärkung der Glucodorticoidwirkung; dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß durch den begleitenden Insulinanstieg keine wesentliche Verschiebung des Insulin-Glucagon-Verhältnisses im Blut zu erwarten ist.
Die erhöhte Glucagonsekretion kann als Sekundäreffekt der

gesteigerten Aminosäurenfreisetzung aus der Muskulatur angesehen werden, da die Hyperglucagonämie in der Regel mit einer Zunahme der extracellulären Alaninkonzentration korreliert (75, 388). Möglicherweise besteht auch ein direkter Glucocorticoideinfluß auf die Glucagonsekretion des Pankreas. In isolierten Pankreasperfusionen war nach Adrenalektomie die glucoseinduzierte Hemmung der Glucagonausschüttung vermindert; sie wurde durch Cortisolsubstitution wiederhergestellt (456).

Hinweise auf synergistische Wirkungen von Glucocorticoiden und Insulin

Außer den dargestellten Antagonismen zwischen Glucocorticoiden und Insulin ergeben sich unter dem Einfluß beider Hormone auch synergistische Effekte, die möglicherweise für physiologische Adaptationsvorgänge Bedeutung haben. Als Beispiel kann das Zusammenwirken der Hormone bei der Glykogensynthese (249, 25o) oder der Induktion der Tyrosinaminotransferase (465) in der Leber genannt werden. In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde über positive Interaktionen bei der Regulation des Proteinstoffwechsels in Herzmuskelzellkulturen berichtet: während alleiniger Cortisolzusatz zum Medium zu einer Hemmung der Proteinsynthese und einer leichten Steigerung der Proteindegradation führte, hatte das Hormon in Gegenwart von Insulin einen synthesesteigernden und deutlich abbauhemmenden Effekt (466). Ob eine ähnliche insulinabhängige Modulationsmöglichkeit der Glucocorticoidwirkung auch in der Skelettmuskulatur existiert, ist bisher unbekannt. Vereinzelte Befunde einer anabolen (467) oder fehlenden katabolen Wirkung (335) niedrigdosierter Glucocorticoidinjektionen könnten auf eine solche Möglichkeit hindeuten.

Zusammenfassung

Die Einschränkung der Glucoseaufnahme und -oxidation und die Zunahme des Effluxes der Gluconeogenesevorläufer Lactat,

Pyruvat und Alanin sind Kennzeichen einer Stoffwechselumstellung in der Skelettmuskulatur in vivo, durch welche die Glucosehomöostase im Hungerzustand gesichert wird.
Die homöostatische Dysregulation der adrenalektomierten Ratte, ihre Aufhebung durch Glucocorticoidsubstitution und die Analogie zwischen experimentellen Hormoneffekten und normalen Veränderungen nach Nahrungsentzug weisen darauf hin, daß die Stoffwechselumstellung der Kontrolle durch Glucocorticoide unterliegt. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, daß ein primärer Kontrollpunkt den Bereich des Proteinumsatzes und Aminosäurentransportes der Muskulatur betrifft. Durch eine Hemmung der Proteinsynthese und / oder Aktivierung des Proteinabbaus scheint die Verfügbarkeit freier Aminosäuren im Muskelzellwasser erhöht und die Aminosäurenabgabe an das Blut gesteigert zu werden. Der Alaninsynthese und -freisetzung kommt unter diesen Bedingungen offenbar eine zentrale Bedeutung zu.
Bezüglich der Glucocorticoidwirkung auf die Glucoseutilisation des Muskels und der Wechselbeziehungen und Antagonismen zum Insulin ist bisher keine definitive Aussage möglich. Auf beide Probleme wird im Rahmen der folgenden Untersuchungen mit dem isolierten Rattenhinterkörper eingegangen.

IV. Ergebnisse und Besprechung der Untersuchungen am isoliert perfundierten Hinterkörper der Ratte

A. Untersuchungen an intakten und adrenalektomierten Ratten

1. Stoffwechselanpassung der perfundierten Muskulatur an die Situation nach Nahrungsentzug: verminderte Alanin- und Glutaminbereitstellung als Symptome des Glucocorticoidmangels

Als typische Merkmale der Hungeradaptation des Muskelstoffwechsels in vivo waren die Verminderung der Glucoseutilisation und die Steigerung der Lactat-, Pyruvat- und Alaninfreisetzung genannt worden (siehe Abb.17). Die Prinzipien dieses Adaptationsvorganges sind, wie die Befunde der folgenden Untersuchungsreihe an intakten (NORM) und adrenalektomierten Ratten (ADX) zeigen, auch bei Perfusionen des isolierten Hinterkörpers nachzuweisen (Abb.33).
Aufgrund der Unterschiede in den arteriellen Substratkonzentrationen zwischen Primärperfusat und Blut und der Abwesenheit von Insulin (und anderen Hormonen) während der Perfusion (Tab.12) sind jedoch graduelle Abweichungen von den in-vivo-Messungen zu beobachten. Die Differenzen weisen zugleich darauf hin, daß den in vivo auftretenden Änderungen der extracellulären Substratkonzentration eine regulative Bedeutung im Rahmen des Anpassungsprozesses zukommt; sie stellen wahrscheinlich ein wichtiges Kopplungselement zwischen Lebergluconeogenese (Abfall der Lactat-, Pyruvat- und Alaninkonzentration im Blut bei gesteigerter Gluconeogeneserate) und der Freisetzung der entsprechenden Gluconeogenesesubstrate aus der Skelettmuskulatur dar.

	in vivo		in vitro
	gefüttert	24 h gehungert	Perfusionsstart
Glucose (mmol/l)	8	5	11
Lactat (mmol/l)	2.5	1.5	1.2
Pyruvat (mmol/l)	0.15	0.07	0.15
Alanin (mmol/l)	0.4	0.2	0.03
Freie Fettsäuren (mmol/l)	0.3	0.8	0.2
Insulin (µU/ml)	40	10	0

Tab.12: Durchschnittliche arterielle Substrat- und Insulinkonzentrationen in vivo und beim Start der Hinterkörperperfusion.
Eine Äquilibrierung zwischen Perfusat und Muskulatur erfolgt in den ersten 1o Minuten der Perfusion; die 6o-minütige "Auswertungsperiode" der Versuche beginnt nach diesem Zeitraum.

Die deutlichste nahrungsabhängige Regulation während Hinterkörperperfusionen betrifft die beiden Hauptsubstrate der Gluconeogenese, Lactat und Alanin, die im Hungerzustand eine signifikant gesteigerte Freisetzungsrate zeigen. Gleichzeitig wird die Pyruvatextraktion aus dem Medium leicht vermindert (Abb.33).
Hauptsymptom des Glucocorticoidmangels (ADX) ist die eingeschränkte Aminosäurenfreisetzung aus der perfundierten Muskulatur. Alaninabgabe und intracellulärer Alaningehalt sind sowohl im Futter- als auch im Hungerzustand signifikant erniedrigt. Der eigentliche Adaptationsmechanismus dagegen zeigt keine wesentliche Abweichung vom Normalbefund; während die Freisetzungskapazität (und damit die Menge des für die Gluconeogenese verfügbaren Präcursorangebotes) dem Einfluß der Glucocorticoide unterliegt, sind für die nahrungsabhängige Modulation der Freisetzungsrate offenbar

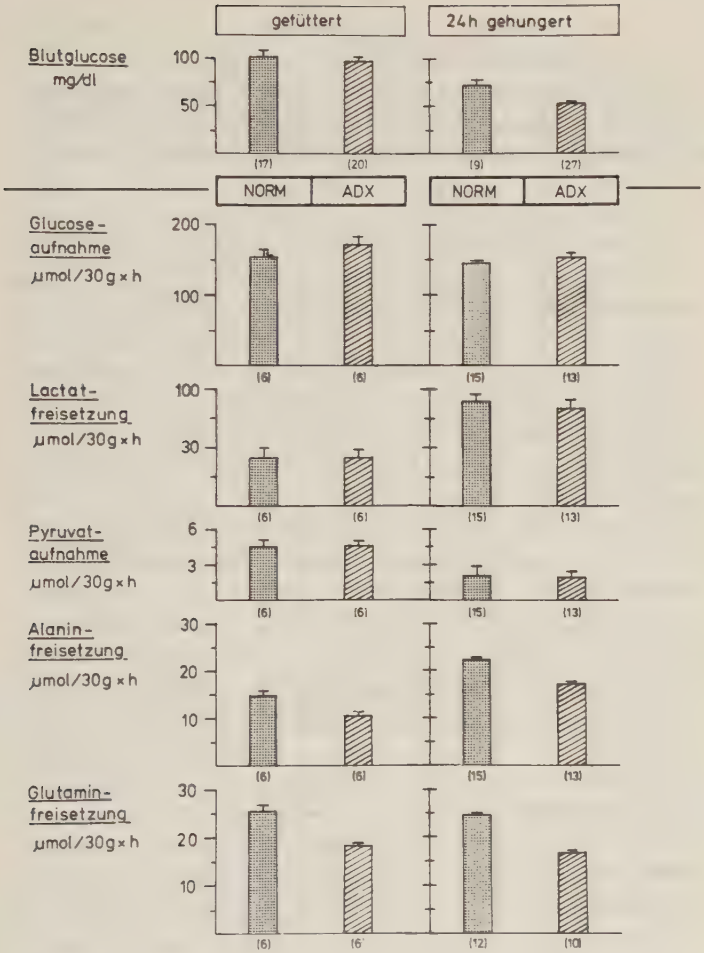


Abb.33: Merkmale der Stoffwechselanpassung des isoliert perfundierten Hinterkörpers normaler (NORM) und adrenalektomierter Ratten (ADX) an einen 24 h-Nahrungsentzug.
Zum Vergleich sind die zum Perfusionszeitpunkt zu messenden Blutglucosekonzentrationen in vivo (Schwanzvene) angegeben.

Abb.33 (Fortsetzung): Metabolite im M.gastrocnemius am Ende von Hinterkörperperfusionen gefütterter und 24 h-gehungerter intakter (NORM) und adrenalektomierter (ADX) Ratten. Mittelwerte und s_{EM}.

Muskelmetabolite	gefüttert		24 h gehungert	
	NORM	ADX	NORM	ADX
Glucose µmol/ml$_{ic}$	(6) 3.35 (± 0.38)	(6) 2.87 (± 0.38)	(12) 1.90 (± 0.18)	(10) 1.86 (± 0.25)
G-6-P µmol/g FG	(6) 0.232 (± 0.022)	(6) 0.239 (± 0.021)	(5) 0.229 (± 0.009)	(6) 0.223 (± 0.029)
Citrat µmol/g FG	(6) 0.180 (± 0.004)	(6) 0.182 (± 0.015)	(6) 0.174 (± 0.013)	(6) 0.189 (± 0.007)
Lactat µmol/ml$_{ic}$	(5) 2.49 (± 0.11)	(5) 1.90 (± 0.09)	(6) 2.78 (± 0.15)	(6) 2.73 (± 0.24)
Pyruvat µmol/ml$_{ic}$	(6) 0.165 (± 0.020)	(5) 0.071 (± 0.014)	(8) 0.219 (± 0.017)	(6) 0.173 (± 0.020)
Glykogen mg/g FG	(6) 5.14 (± 0.24)	(6) 4.45 (± 0.33)	(12) 3.92 (± 0.10)	(12) 3.53 (± 0.07)
Alanin µmol/ml$_{ic}$	(5) 3.69 (± 0.24)	(6) 2.67 (± 0.14)	(12) 3.99 (± 0.14)	(12) 3.20 (± 0.06)
Gradient ic/ec	15	14	10	10

andere Faktoren ausschlaggebend. Wie noch dargestellt wird, kommt dabei wahrscheinlich dem Rückgang der Insulinwirkung und der Hemmung der Pyruvatoxidation eine wichtige Bedeutung zu. Als Hinweis auf die gesteigerte Pyruvatverfügbarkeit im Hungerzustand ist der Anstieg der intracellulären Pyruvatkonzentration des Muskels zu werten; er findet sich auch beim adrenalektomierten Tier, bei dem der Pyruvatgehalt im Futterzustand signifikant erniedrigt ist. Für die gleichzeitige Veränderung des Alanintransportes spricht die mit der Zunahme der Effluxrate verbundene Senkung des Konzentrationsgradienten über die Muskelfasermembran.

Neben Alanin wird auch die Glutaminfreisetzung aus der Muskulatur nach Adrenalektomie signifikant verringert. Interessanterweise bleibt jedoch bei dieser Aminosäure die typische nahrungsabhängige Änderung der Freisetzungsrate aus. Dieser Befund, der auch für ein anderes Muskelpräparat beschrieben wurde (52) und mit den Verhältnissen in vivo übereinstimmt (174), läßt darauf schließen, daß Glutamin für die Regulation der Kurzzeitgluconeogenese von untergeordneter Bedeutung ist. Er findet seine Erklärung in der später gezeigten geringen Abhängigkeit der Freisetzungsrate von Insulinzusätzen zum Perfusat und ihrem Rückgang bei Zunahme des Pyruvat- oder Lactatgehaltes der Muskulatur.

Die auffällige Dissoziation zwischen Anstieg der Alanin- und Konstanz der Glutaminabgabe nach Nahrungsentzug spricht für eine Bevorzugung der de-novo-Alaninsynthese aus Pyruvat und Glutamat (Abb.34) in dieser Situation.

Der Syntheseprozess scheint durch das Fehlen der Glucocorticoide beeinträchtigt zu sein. Die signifikant erniedrigten Glutamin- und Alaningehalte der Muskulatur bei normalem Glutamatgehalt weisen darauf hin, daß ein Defizit an transaminierbarem Pyruvat und NH_3-liefernden Aminosäuren die Alanin- und Glutaminsynthese beim adrenalektomierten Tier einschränkt (Abb.35). Gemeinsame Ursache

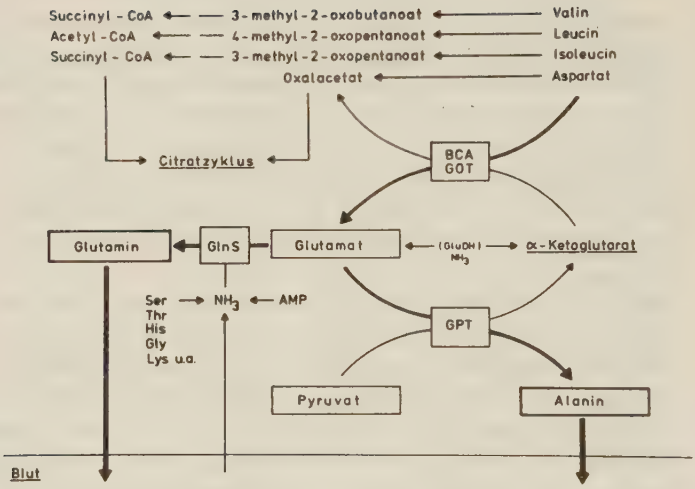


Abb.34: System der Alanin- und Glutaminsynthese der Skelettmuskulatur.

Die Glutamatverfügbarkeit des Muskels wird bestimmt durch die Transaminierungsrate von verzweigtkettigen Aminosäuren (Val, Leu, Ile) und Aspartat, daneben durch die Netto-Proteolyserate und die Aufnahme aus dem Blut.
Glutamat-, Pyruvat- und NH_3-Verfügbarkeit entscheiden über den Umfang der Alanin- und Glutaminsynthese.
Durch die Einschleusung der Kohlenstoffskelette von Valin, Isoleucin und Aspartat in den Citratzyklus (via Succinyl-CoA und Oxalacetat) können diese Aminosäuren sowohl zur Erhöhung der Glutamat- als auch der Pyruvatverfügbarkeit beitragen. Der Entstehungsweg des Pyruvats verläuft dabei wahrscheinlich über die im Muskel in geringer Konzentration vorhandenen Enzyme PEP-Carboxykinase und NADP-abhängige Malatdehydrogenase (malic enzyme)(zur Übersicht 469 - 471).

BCA: Branched-chain-aminotransferase
GOT: Aspartataminotransferase
GPT: Alaninaminotransferase
GlnS:Glutaminsynthetase

der Störung kann eine erhöhte Pyruvatoxidation und ein veränderter Proteinumsatz dieser Tiere sein, durch den die intracelluläre Verfügbarkeit pyruvatbildender und desaminierbarer Aminosäuren vermindert wird. Anhaltspunkte dafür ergeben sich aus verschiedenen noch zu besprechenden Perfusionsexperimenten.

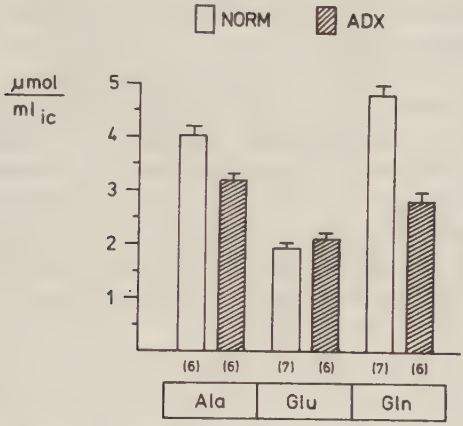


Abb.35: Alanin-, Glutamin- und Glutamatgehalte der Muskulatur 24 h-gehungerter intakter (NORM) und adrenalektomierter Ratten(ADX).
Aufgrund des geringeren "Verbrauchs" für die Alanin- und Glutaminsynthese liegt der Glutamatgehalt der adrenalektomierten Tiere im Normbereich. Mittelwerte und s_{EM}.

Ein überraschender Befund im Rahmen dieser Untersuchungsreihe ist die weitgehend identische Glucoseaufnahmerate bei gefütterten und gehungerten Tieren. Hinweise auf eine während der Perfusion "überdauernde" Insulinwirkung im Futterzustand, wie sie kürzlich nach einer vorausgegangenen Insulininfusion beschrieben wurde (472) oder im Anschluß an eine Insulinsubstitution in vivo zu messen ist (eigene Befunde), ergeben sich nicht. Der Befund stimmt mit dem Resultat von Perfusions- und Inkubationsexperimenten anderer Untersucher überein, die an der Muskulatur hungernder Ratten eine unveränderte basale und gesteigerte

insulinsensitive Glucoseaufnahme zeigen konnten (461, 463).

Zugleich sprechen die unveränderte Glucoseutilisation und die von der Nahrungszufuhr unabhängigen, konstanten Citrat- und Glucose-6-phosphat-Konzentrationen des M. gastrocnemius (Abb.33) gegen eine entscheidende regulative Bedeutung von Lipolyseprodukten für die Glucoseaufnahme der Skelettmuskulatur im Hungerzustand (Abb.36). Da es während der insulinfreien Perfusionen zu einem nicht unerheblichen Anstieg der freien Fettsäuren im Perfusat kommt (Abb.37), kann ein Substratmangel als Ursache des negativen Befundes ausgeschlossen werden. Er deckt sich im übrigen mit den zahlreichen Untersuchungen, die unter artifizieller Erhöhung der Fettsäuren- und Ketonkörperkonzentration im Perfusionsmedium zwar eine Hemmung der Pyruvat- und Lactatoxidation des durchströmten Hinterkörpers, aber keine Reduzierung der Glucoseaufnahme fanden (96, 185, 473, 468, 445, 474).

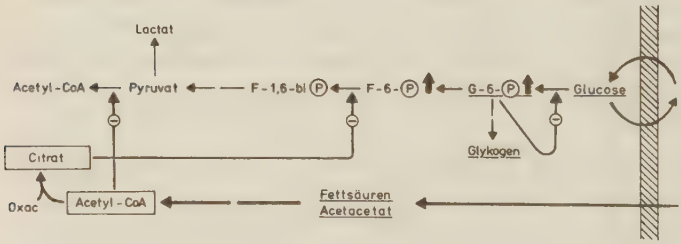


Abb.36: Sequenz der Hemmung von Glykolyse und Glucoseaufnahme durch Lipolyseprodukte. Der dargestellte Mechanismus scheint für Herz-, Diaphragma- und "rote" Muskulatur (slow-twitch- und fast-twitch-oxidative Muskeln) (285, 424, 475, 476), nicht jedoch für "weiße" fast-twitch-glykolytische Muskeln (bei der Ratte etwa 5o % der Hinterkörpermuskulatur) zuzutreffen.

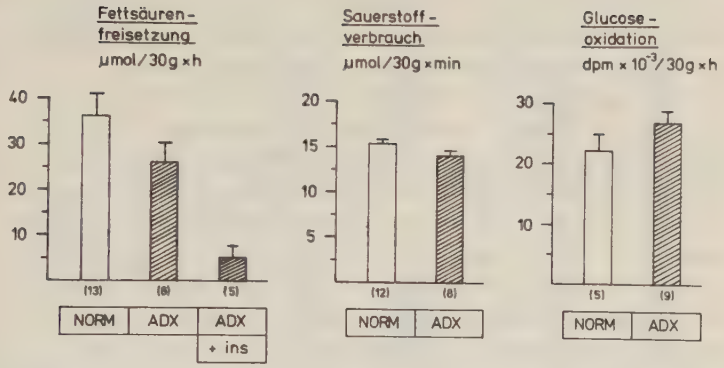


Abb.37: Fettsäurenfreisetzung, Sauerstoffaufnahme und Glucoseoxidation während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter intakter (NORM) und adrenalektomierter Ratten (ADX). Mit Ausnahme der Senkung der Fettsäurenfreisetzung durch Insulin (1 mU/ml), sind die Unterschiede nicht signifikant.
Die Kinetik der Fettsäurenfreisetzung (6o - 7o % der gesamten Freisetzung erfolgt in den ersten 2o Minuten der Perfusion) spricht dafür, daß es sich zum Teil um einen Ausstrom von in vivo in der Muskulatur akkummulierten Fettsäuren handelt, die unter Insulinzusatz zum Perfusat verestert werden. Mittelwerte und s_{EM}.

Zusammenfassung

Der typische Anpassungsvorgang des Muskelstoffwechsels an den Hungerzustand, Steigerung der Lactat-, Pyruvat- und Alaninfreisetzung, wird durch Adrenalektomie nicht wesentlich verändert. Die Unterschiede zum Normaltier sind quantitativer Natur und betreffen, in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (46, 311), die Aminosäurenbereitstellung durch die Muskulatur.
Sowohl im Futter- als auch im Hungerzustand ist die Alanin- und Glutaminfreisetzung durch den perfundierten Hinterkörper der adrenalektomierten Ratte, wahrscheinlich als Folge einer reduzierten Proteolyse- und de-novo-Syntheserate, herabgesetzt. Im Falle des Alanins scheint dabei eine (möglicherweise aus dem veränderten Aminosäurenumsatz ab-

zuleitende) verminderte intracelluläre Pyruvatverfügbarkeit, im Falle des Glutamins die geringere Bereitstellung NH_3-liefernder Aminosäuren von Bedeutung zu sein.
Der Glucosestoffwechsel des isolierten Hinterkörpers wird nach Adrenalektomie nicht wesentlich verändert. Eine gesteigerte Oxidation von Glucosekohlenstoff deutet sich zwar an, ist aber statistisch nicht gesichert. Der Pyruvatgehalt der Muskulatur adrenalektomierter Ratten ist vermindert.
Die von der Nahrungszufuhr unabhängige Glucoseaufnahme und die konstanten Citrat- und Glucose-6-phosphat-Gehalte des perfundierten Muskels weisen darauf hin, daß für die nahrungsabhängige Regulation der Glucoseutilisation aktuelle Änderungen der Insulinkonzentration im Blut von primärer Bedeutung sind.

2. Die Wirkung einer einmaligen und mehrtägigen Betamethasonsubstitution auf den Muskelstoffwechsel der gehungerten adrenalektomierten Ratte: Steigerung der Alaninbereitstellung unter Rückgang der Glucoseutilisation

Bereits 3 - 4 Stunden nach einer einmaligen Betamethasoninjektion (5oo µg/1oo g KG) ist der Blutglucosegehalt der hungernden adrenalektomierten Ratte normalisiert; fünftägige Betamethasonsubstitution (2 x 1oo µg/1oo g KG x d) hebt die Hypoglykämieneigung dieser Tiere unter Nahrungsentzug vollständig auf (Abb. 38). Als Äquivalente der wiederhergestellten Glucosehomöostase in vivo finden sich Veränderungen der Aminosäurenbereitstellung und Glucoseutilisation durch die Muskulatur. Die Alaninfreisetzung durch den perfundierten Hinterkörper dieser Ratten wird bereits nach einmaliger Glucocorticoidapplikation hochsignifikant gesteigert. Gleichzeitig ist ein Anstieg der intracellulären Alaninkonzentration zu messen, der allerdings im Vergleich zur Veränderung der Effluxrate weniger deutlich ausgeprägt ist und schon zu Beginn der Perfusion besteht. Eine signifikante Abnahme des Muskelalaningehaltes

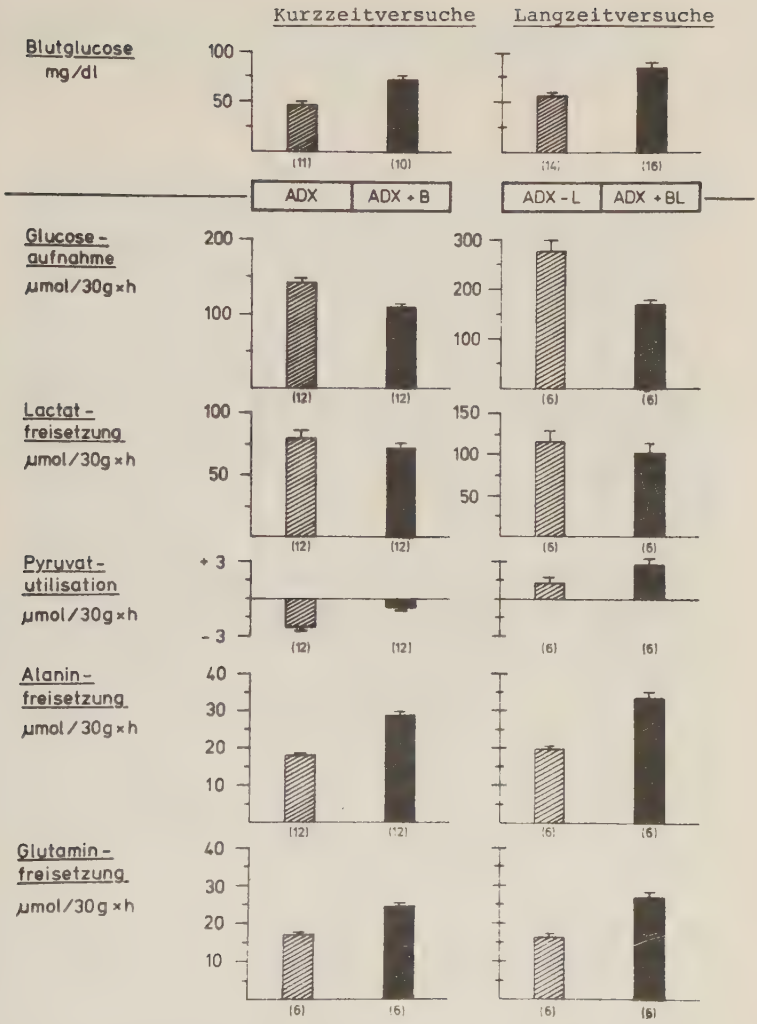


Abb.38: Stoffwechseländerungen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten (ADX) 3 - 4 Stunden nach einmaliger Injektion (ADX + B: 5oo µg/1oo g KG) oder fünftägiger Substitution (ADX + BL: 2 x 1oo µg/1oo g KG x d) von Betamethason (ADX-L: ADX mit täglichen NaCl-Injektionen). Zum Vergleich sind die zum Perfusionszeitpunkt zu messenden Blutglucosekonzentrationen in vivo (Schwanzvene) angegeben. Mittelwerte und s_{EM}.

Abb.38 (Fortsetzung): Metabolite des M.gastrocnemius am Ende von Hinterkörperperfusionen adrenalektomierter Ratten ohne (ADX, ADX-L) und mit Betamethasonsubstitution (+B, +BL). Mittelwerte und s_{EM}.

ADX-L: Adrenalektomierte Ratten mit täglichen NaCl-Injektionen.

Muskelmetabolite	ADX	ADX + B	ADX-L	ADX + BL
Lactat $\mu mol/ml_{ic}$	(6) 2.73 (± 0.24)	(6) 2.37 (± 0.20)	(6) 2.96 (± 0.50)	(6) 2.47 (± 0.11)
Pyruvat $\mu mol/ml_{ic}$	(6) 0.173 (± 0.020)	(6) 0.176 (± 0.010)	(6) 0.234 (± 0.033)	(6) 0.243 (± 0.015)
Glykogen mg/g FG	(12) 3.53 (± 0.07)	(12) 3.82 (± 0.06)	(6) 3.52 (± 0.21)	(6) 4.55 (± 0.25)
Alanin $\mu mol/ml_{ic}$	(12) 3.20 (± 0.06)	(6) 3.65 (± 0.13)	(6) 3.36 (± 0.08)	(6) 3.79 (± 0.13)
Gradient ic/ec	10	7.5	10	7.4

während der Perfusion tritt nicht ein (Tab.13), so daß die Freisetzungsrate als ein direktes Maß der gesteigerten intracellulären Alaninverfügbarkeit anzusehen ist.

	Alanin$_{ic}$ (µmol/30g) 0 min	60min	Δ0-60 min	Freisetzung (µmol/30g×h)
ADX	57.7 (6) (±1.6)	54.2 (6) (±1.0)	-3.5	17.96 (12) (±0.33)
ADX+B	64.1 (6) (±2.0)	62.1 (6) (±2.1)	-2.0	28.59 (12) (±0.84)

Tab.13: Konzentration freien Alanins im M. gastrocnemius zu Beginn und am Ende der Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit einmaliger Betamethasonvorbehandlung (ADX + B: 5oo µg/1oo g KG).
Die Daten sind bezogen auf 3o g Muskulatur (17 ml Intracellulärwasser). Mittelwerte und s_{EM}.

Die im Vergleich zur Veränderung des Muskelalaninpools erhebliche Steigerung der Effluxrate, die verbunden ist mit einer Abnahme des Konzentrationsgradienten über die Zellmembran, läßt darauf schließen, daß neben der erhöhten Alaninentstehung auch der Transport der Aminosäure durch Glucocorticoide modifiziert wird. Aufgrund der bisherigen Befunde (318-322, 257) ist an eine Hemmung der Wiederaufnahme freigesetzten Alanins in die Muskelfaser zu denken.

Entsprechend der Ausfallserscheinungen am adrenalektomierten Tier wird auch die Glutaminfreisetzung durch Glucocorticoide signifikant beeinflußt. Die Zunahme der Freisetzungsrate ist jedoch geringer ausgeprägt als beim Alanin und

kann zum Teil auf eine Abnahme der intracellulären Konzentration während des Perfusionsverlaufes zurückgeführt werden (Tab. 14).

	$Glutamin_{ic}$ (µmol/30g) 0 min	60 min	Δ0-60 min	Freisetzung (µmol/30g × h)
ADX	54.5 (±1.5) (6)	47.9 (±3.0) (6)	-6.6	16.92 (±0.42) (6)
ADX+B	58.6 (±2.7) (6)	50.1 (±3.3) (6)	-8.5	24.11 (±0.83) (6)

Tab. 14: Konzentration freien Glutamins im M. gastrocnemius zu Beginn und am Ende der Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit einmaliger Betamethasonvorbehandlung (ADX + B: 5oo µg/1oo g KG).
Die Daten sind bezogen auf 3o g Muskulatur (17 ml Intracellulärwasser). Mittelwerte und s_{EM}.

In Analogie zur Situation nach Nahrungsentzug wird damit durch Glucocorticoide die Alanin- gegenüber der Glutaminbereitstellung aus der Skelettmuskulatur begünstigt.
Als Grundlage des Effektes kann die erhöhte Freisetzung der Aminosäure aus Muskelproteinen und die gesteigerte de-novo-Synthese im Intermediärstoffwechsel der Muskulatur angesehen werden. Dem Vorgang der de-novo-Synthese kommt wahrscheinlich die größere Bedeutung zu, da unter Berücksichtigung von Daten zur Steigerung des Netto-Proteinabbaus nach einmaliger Betamethasoninjektion (siehe Tabelle 11) nur etwa 3 - 4 µmol/3o g Muskulatur x h

proteinogenes Alanin vermehrt freigesetzt werden. Dieser Anteil kann sich nach mehrtägiger Betamethasonsubstitution beträchtlich erhöhen.
Neben der Steigerung der Aminosäurenverfügbarkeit wird durch Betamethasonvorbehandlung adrenalektomierter Ratten die Glucoseutilisation des Hinterkörperpräparates signifikant vermindert. Der Befund, der in verschiedenen Untersuchungsreihen reproduzierbar darzustellen ist (Abb.39), entspricht prozentual (Hemmeffekt von durchschnittlich 2o % - 5o % der Kontrollwerte) den Ergebnissen, die für Fettgewebe (477-481), Hautinkubate (482, 483) und lymphocytäre Gewebe (484-486) angegeben wurden. Während der akute Hemmeffekt relativ schwach ausgeprägt und möglicherweise partiell auf den Stoffwechsel des im Präparat noch vorhandenen Fettgewebes (1 - 2 g) und durchströmter Hautareale zurückzuführen ist (unter Zugrundelegung von Daten in (48o, 482) könnte theoretisch eine Glucoseaufnahmehemmung von 1o - 2o µmol/h durch die Glucocorticoidwirkung auf diese Gewebe erklärt werden), kann die starke Wirkung mehrtägiger Hormonsubstitution nur durch eine Änderung der muskulären Glucoseutilisation erklärt werden. Die Ursache für die höhere basale Glucoseaufnahmerate dieser Tiere, die analog zum hormonsubstituierten Kollektiv tägliche Injektionen physiologischer Kochsalzlösung (2 x 0.1 ml/d) erhielten, ist unbekannt. Das Phänomen wiederholte sich in zwei weiteren Reihen mit adrenalektomierten Ratten; dagegen kam es nach täglichen NaCl-Injektionen bei adrenalektomiert-diabetischen Tieren zu einer verminderten Glucoseaufnahme. In jeder dieser Versuchsreihen war der glucocorticoidbedingte Hemmeffekt prozentual und auch quantitativ weitgehend identisch (mehrtägig substituierte Reihen in Abb.39).
Im Vergleich zu den Änderungen der Glucoseaufnahme werden Lactatbildung und Pyruvatutilisation durch Betamethasonapplikation nur wenig beeinflußt. Allgemein ist ein Trend zu verminderter Lactatfreisetzung und -akkumulation im Muskel und geringerer Pyruvatextraktion aus dem Medium

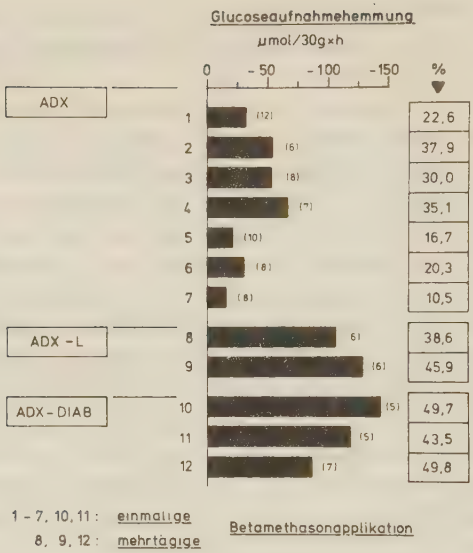


Abb.39: Betamethasonbedingte Glucoseaufnahmehemmung in verschiedenen unabhängigen Untersuchungsreihen mit dem isoliert perfundierten Hinterkörper adrenalektomierter (ADX) und adrenalektomiert-diabetischer Ratten (ADX-DIAB).
Die Betamethasondosierung betrug 5oo µg/1oo g KG bei einmaliger und 2oo µg/1oo g KG (ADX-L)oder 15o µg/1oo g KG (ADX-DIAB) bei mehrtägiger Substitution.
Sehr deutliche Hemmeffekte nach einmaliger Betamethasoninjektion ergaben sich in 3 Versuchsreihen (2 - 4) mit Lactat- und Pyruvatzusätzen (3 - 9 mmol/l) zum Perfusionsmedium, schwache Effekte in Reihen (5 - 7) mit Aminosäurenzusätzen (5 mmol/l Leucin, Valin oder Aspartat).

festzustellen. Die veränderte Relation zwischen den beiden Substraten findet in den meisten Versuchsreihen ihren Ausdruck in einer signifikanten Abnahme des Lactat/Pyruvat-Quotienten im Verlaufe der Perfusion (Abb.4o).
Zugleich ist eine signifikante Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung aus Glucosekohlenstoff zu messen (Abb.41), die prozentual etwas stärker ausgeprägt erscheint als die Verminderung der Glucoseaufnahme. In welchem Umfang dieser Befund einer

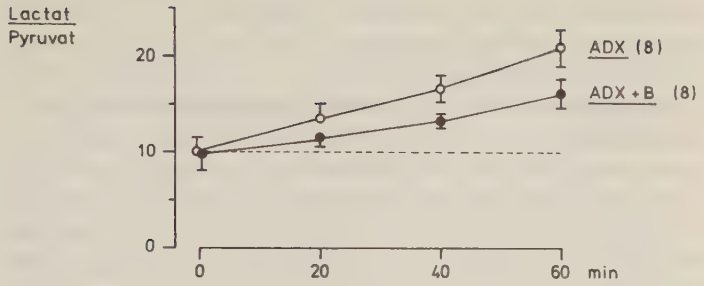


Abb.4o: Typisches Verhalten des Lactat/Pyruvat-Quotienten im Medium während Perfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit einmaliger Betamethasonvorbehandlung (ADX + B: 5oo µg/1oo g KG). Der regelmäßige Anstieg des Quotienten im Verlauf der Perfusion ist typisch für die ruhende Muskulatur und keinesfalls Ausdruck einer Hypoxie; im Anschluß an Muskelarbeit in vitro erfolgt eine sehr rasche Einstellung des Quotienten auf Werte um 12 (siehe Tab.8). Mittelwerte und s_E.

Einschränkung der Pyruvatoxidation auf der Ebene der Pyruvatdehydrogenase entspricht, ist schwer zu sagen. Untersuchungen unseres Institutes (629) ergaben keinen Anhalt für eine kurzfristige glucocorticoidbedingte Hemmung der Substratdurchsatzrate durch den Enzymkomplex.

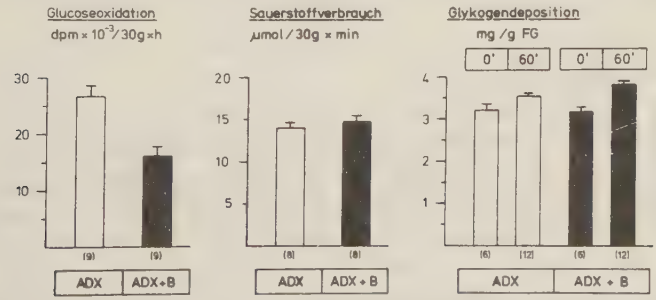


Abb.41: Glucoseoxidation, Sauerstoffverbrauch und Glykogensynthese während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit einmaliger Betamethasoninjektion (ADX + B: 5oo µg/1oo g KG) Mittelwerte und s_{EM}.

Der Rückgang der Glucoseoxidation ist im Akutexperiment nicht von einer entsprechenden Abnahme des Sauerstoffverbrauches begleitet, so daß an eine vermehrte Oxidation anderer Substrate zu denken ist. Ob dabei, ähnlich wie im Hungerzustand, Lipolyseprodukte und verzweigtkettige Aminosäuren eine Rolle spielen, ist unklar. Unter Verminderung der Glucoseoxidation soll die Palmitatoxidation schon kurz nach Cortisolgabe in vivo zunehmen (488), und eine Stimulation der Leucinoxidation durch die Skelettmuskulatur wurde nach einmaliger Corticosterongabe am Kaninchen beschrieben (487). Eigene Untersuchungen und die Ergebnisse anderer Autoren (311) sprechen jedoch gegen einen direkten Glucocorticoideinfluß auf die Oxidation verzweigtkettiger Aminosäuren.
Die geringere Glucoseutilisation durch die Muskulatur betamethasonbehandelter Ratten führt nicht zu einer Störung der Glykogendeposition ; die signifikante Zunahme des Glykogengehaltes im Verlauf der Perfusion (Abb.41) ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die verminderte Glucoseaufnahmerate kompensiert wird durch eine gleichzeitige intracelluläre Einsparung von Glucosekohlenstoff. Der deutliche Anstieg des Glykogengehaltes nach mehrtägiger Substitution kann als Folge einer erhöhten Insulinsekretion in vivo (359, 451) angesehen werden, da ein vergleichbarer Effekt an adrenalektomiert-diabetischen Ratten nicht zu beobachten ist.

Zusammenfassung

Die Hauptwirkung akuter und mehrtägiger Glucocorticoidsubstitution auf den Muskelstoffwechsel adrenalektomierter Ratten ist die Korrektur der verminderten Aminosäurenbereitstellung. Der hohe Anstieg der Alaninfreisetzung weist darauf hin, daß nicht nur die Bereitstellung aus Muskelprotein, sondern auch die de-novo-Synthese dieser Aminosäure durch eine erhöhte Pyruvat- und Glutamatverfügbarkeit nach Glucocorticoidgabe gesteigert wird. In Übereinstimmung mit der Situation nach Nahrungsentzug ist die Alanin- gegen-

über der Glutaminbildung bevorzugt.
Aus den Ausfallserscheinungen nach Adrenalektomie nicht direkt abzuleiten ist der hemmende Glucocorticoideffekt auf die Glucoseutilisation der Skelettmuskulatur, der besonders nach mehrtägiger Hormonsubstitution deutlich wird. Die Größenordnung des Effektes (Einsparung von rund 1 µmol/g Muskel x h im Akut- und 3 - 4 µmol/g Muskel x h im Langzeitexperiment) macht verständlich, warum es in der Vergangenheit so schwierig war, die Glucoseaufnahmehemmung an kleinen Muskelpräparaten (Diaphragma, Herzmuskel, M. soleus) nachzuweisen. Obwohl quantitativ scheinbar unbedeutend, ist dieser Effekt Voraussetzung für die typische Kohlenhydratanreicherung im Organismus nach Applikation höherer Glucocorticoiddosen (siehe Abb.22). Erst auf der Grundlage der Glucoseeinsparung durch die Muskulatur ist die Glykogendeposition in der Leber zu erklären (Abb. 42).

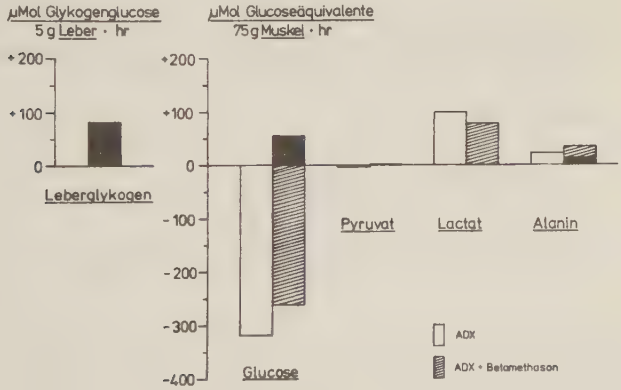


Abb.42: Vergleich der Leberglykogensynthese in vivo (3.5-4.5 h nach Injektion von 5oo µg/1oo g KG Betamethason) mit den im gleichen Zeitraum zu messenden Veränderungen der Glucoseutilisation und der Freisetzung glucoplastischer Präcursoren aus der perfundierten Muskulatur. Die Bilanz bezieht sich auf eine 24 h-gehungerte, 18o g schwere adrenalektomierte Ratte.
7o% der abgelagerten Glykogenglucose läßt sich mit der Glucoseaufnahmehemmung, 15% mit der gesteigerten Alaninfreisetzung korrelieren (schwarze Säulenabschnitte); die restlichen 15% entstammen anderen Quellen.

Da die Lactatfreisetzung der adrenalektomierten Ratte durch Glucocorticoidgabe nicht gesteigert wird, ist Alanin in dieser Situation das Hauptsubstrat der Lebergluconeogenese. Legt man eine komplette Umwandlung des vermehrt freigesetzten Alanins zu Glucose zugrunde, ist sein Anteil an der Gluconeogeneserate mit etwa 5o % zu veranschlagen.

3. Modelluntersuchungen zum Mechanismus der Glucocorticoidwirkung auf die Alaninsynthese: Pyruvat- und aminosäurenstimulierte Alaninfreisetzung aus der Muskulatur der adrenalektomierten Ratte

Aufgrund der durch das Massenwirkungsgesetz vorgegebenen Gleichgewichtsbedingungen in der Alaninaminotransferase-Reaktion (Glutamat-Pyruvat-Transaminase, EC 2.6.1.2):

$$\frac{[\text{Alanin}] \times [\alpha\text{-Ketoglutarat}]}{[\text{Pyruvat}] \times [\text{Glutamat}]} = \underline{1.52} \quad \text{(nach 489)}$$

oder

$$[\text{Alanin}] = \frac{[\text{Glutamat}]}{[\alpha\text{-Ketoglutarat}]} \times [\text{Pyruvat}] \times 1.52$$

wird die de-novo-Alaninsynthese bestimmt durch die Glutamat-, α-Ketoglutarat- und Pyruvatkonzentration innerhalb der Muskelfaser. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, daß sowohl ein Glutamatangebot selbst (83, 82, 49o) als auch das Angebot glutamatliefernder Aminosäuren (Leucin, Valin, Isoleucin und Aspartat) die Alaninbildung isolierter Muskelpräparate steigern können (8o, 83, 82, 49o, 491, 77, 78, 47, 492). Verminderung des Glutamat/α-Ketoglutarat-Verhältnisses durch Zusatz von α-Ketoanalogen verzweigtkettiger Aminosäuren (mit konsekutiver Bildung dieser

Aminosäuren unter Glutamatverbrauch) führte demgegenüber zu einem Rückgang der Alaninfreisetzung aus dem isolierten Diaphragma (469) oder dem perfundierten Hinterkörper (491). Auf der anderen Seite wurde bei in-vitro-Experimenten eine Korrelation der de-novo-Alaninsynthese mit der intracellulären Pyruvatkonzentration (493) oder mit einem exogenen Angebot von Glucose, Pyruvat oder Lactat (77, 78, 81, 49o, 497) beobachtet. Förderung der Pyruvatoxidation durch Gabe von Dichloracetat, einem Aktivator der Pyruvatdehydrogenase (494), führte zur Abnahme der Alaninfreisetzung (82, 49o, 495, 496).
Aufgrund der bisherigen Befunde ist nicht zu entscheiden, welche dieser Faktoren tatsächlich über die aktuelle Rate der Alaninsynthese und -freisetzung in vivo entscheiden. Während das bereits besprochene Konzept des "Glucose-Alanin-Zyklus" das Hauptgewicht der Regulation auf Änderungen der glykolytischen Pyruvatverfügbarkeit legt, sprechen sich mehrere Autoren (8o, 83, 469) für die primäre Bedeutung einer veränderten Verfügbarkeit glutamat- und pyruvatbildender Aminosäuren aus. Der Zu- oder Abnahme der im Muskel metabolisierbaren verzweigtkettigen Aminosäuren wird dabei eine besondere Rolle zugeschrieben.

Hinweise auf die Steigerung der Verfügbarkeit von pyruvat- und glutamatbildenden Aminosäuren durch Glucocorticoide

Auf die mögliche Beziehung zwischen glucocorticoidbedingter Einschränkung der Pyruvatutilisation, Zunahme der Aminosäurenfreisetzung aus Muskelprotein und de-novo-Alaninsynthese wurde bereits mehrfach hingewiesen. So läßt sich bei der adrenalektomierten Ratte, vor allem im Futterzustand, die verminderte Alaninfreisetzung mit einem geringeren Pyruvatgehalt der Muskulatur korrelieren (Abb.43). Obwohl Glucocorticoidsubstitution keinen signifikant meßbaren Effekt auf die stationäre Pyruvatkonzentration des Muskels hungernder adrenalektomierter Ratten hat (siehe Abb.38), lassen gering erscheinende, jedoch regelmäßig auftretende

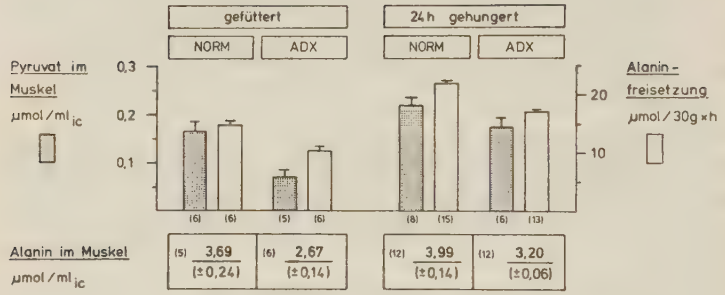


Abb.43: Pyruvat- und Alaningehalt des M. gastrocnemius und Alaninfreisetzung während Hinterkörperperfusionen normaler (NORM) und adrenalektomierter Ratten (ADX).
Die geringe Differenz der Pyruvatkonzentrationen im Hungerzustand weist darauf hin, daß die verminderte Pyruvatverfügbarkeit der adrenalektomierten Ratte nicht alleinige Ursache der verminderten Alaninbereitstellung ist.
Mittelwerte und s_{EM}.

Änderungen der Pyruvatutilisation und des Lactat/Pyruvat-Verhältnisses auf eine gesteigerte intracelluläre Pyruvatverfügbarkeit nach Glucocorticoidgabe schließen.
Diese Vermutung wird bestätigt in Experimenten, in denen die Pyruvatbildung der Muskulatur durch Insulinzusatz zum Perfusionsmedium oder durch Muskelarbeit in vitro (Elektroreizung der Nn. ischiadici) stimuliert wird (Abb.44).
Die in diesen Situationen verminderte Pyruvatfreisetzung adrenalektomierter Ratten wird durch Betamethasonvorbehandlung der Tiere aufgehoben. Erhöhte Pyruvatkonzentrationen im Blut unter einer Glucocorticoidtherapie oder beim CUSHING-Syndrom sind im übrigen ein in der Vergangenheit häufig beschriebener Befund, der als Ausdruck einer eingeschränkten Pyruvatutilisation gewertet wurde (498-5o4); er trifft offenbar auch für die in-vivo-Situation

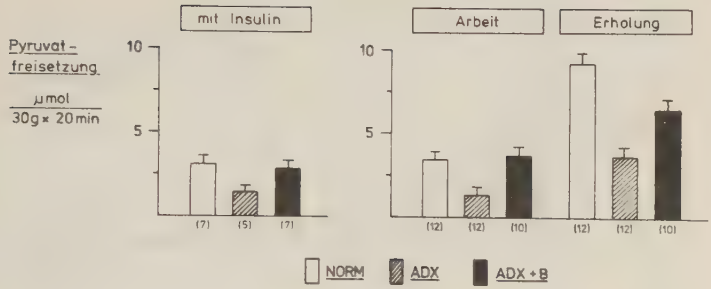


Abb.44: Pyruvatfreisetzung während isolierter Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter normaler (NORM) und adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit einmaliger Betamethasonvorbehandlung (ADX + B: 5oo µg/1oo g KG) unter Insulinzusatz zum Perfusat (1 mU/ml) oder während (Arbeit) und nach Elektrostimulation (Erholung) beider Nn. ischiadici. Mittelwerte und s_{EM}.

nach Cortisolgabe bei Ratten zu (488) und findet möglicherweise seine Erklärung in den Ergebnissen dieser Versuche.

Parallel zu den wenig auffälligen Veränderungen der Pyruvatverfügbarkeit wird, als Zeichen einer Hemmung der Proteinsynthese und/oder einer Steigerung proteolytischer Vorgänge, schon wenige Stunden nach Betamethasoninjektion außer Alanin und Glutamin die Freisetzung zahlreicher anderer Aminosäuren signifikant erhöht (Abb.45). Hinsichtlich der Glutamatbereitstellung sind, neben Aspartat, Asparagin und Glutamat selbst, die in den Intermediärstoffwechsel des Muskels einzuschleusenden verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin besonders interessant (166, 168, 492, 5o5, 5o6). Ihre Freisetzungsrate repräsentiert weitgehend die intracelluläre Verfügbarkeit; der Konzentrationsgradient über die Muskelfasermembran ist annähernd 1 (Tab.15). Trotz der gesteigerten Verfügbarkeit dieser Aminosäuren und im Gegensatz zu der sehr unterschiedlichen

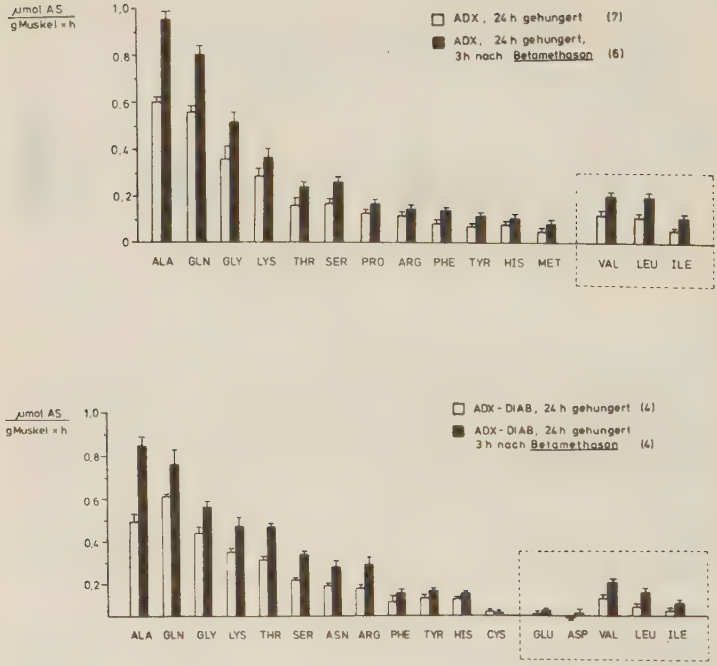


Abb.45: Steigerung der Aminosäurenfreisetzung aus dem perfundierten Hinterkörper 24 h-gehungerter adrenalektomierter (ADX) und adrenalektomiert-diabetischer Ratten (ADX-DIAB) 3 - 4 h nach Betamethasonapplikation (5oo µg/1oo g KG). Befunde an adrenalektomierten Ratten (ADX) nach R.THIENHAUS und W.STAIB (46), ergänzt um eigene Ergebnisse (Alanin- und Glutaminfreisetzung). Mittelwerte und s_{EM}.

Etwa 1/4 der Alanin- und Glutaminfreisetzungsrate läßt sich auf eine Bereitstellung dieser Aminosäuren aus dem Muskelprotein zurückführen. Der übrige Anteil entsteht wahrscheinlich durch eine de-novo-Synthese im Intermediärstoffwechsel der Muskulatur. Die harmonische Anpassung der de-novo-Syntheserate an die allgemeine Erhöhung der Aminosäurenverfügbarkeit weist auf die enge funktionelle Beziehung zwischen beiden Prozessen hin. Glucocorticoide steigern sowohl die Freisetzungsrate aus Muskelprotein als auch die de-novo-Synthese beider Aminosäuren.

nmol/g Muskel und ic/ec - Gradient

	Valin	Leucin	Isoleucin
ADX (6)	205 (± 8)	138 (± 7)	98 (± 5)
	1.4	1.0	1.1
ADX + B (6)	276 (± 20)	179 (± 17)	124 (± 11)
	1.1	0.8	0.9
ADX + BL (5)	344 (± 15)	201 (± 16)	163 (± 16)
	1.7	1.2	1.6

Tab.15: Anstieg der intracellulären Konzentration verzweigtkettiger Aminosäuren im M. gastrocnemius 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten (ADX) 3 - 4 h nach Betamethasoninjektion (ADX + B: 500 µg/100 g KG) und nach 5-tägiger Betamethasonsubstitution (ADX + BL: 500 µg/100 g KG x d). Mittelwerte und s_{EM}.

Bildungsrate von Alanin und Glutamin, wird die intracelluläre Glutamatkonzentration nicht wesentlich verändert (Abb.46).

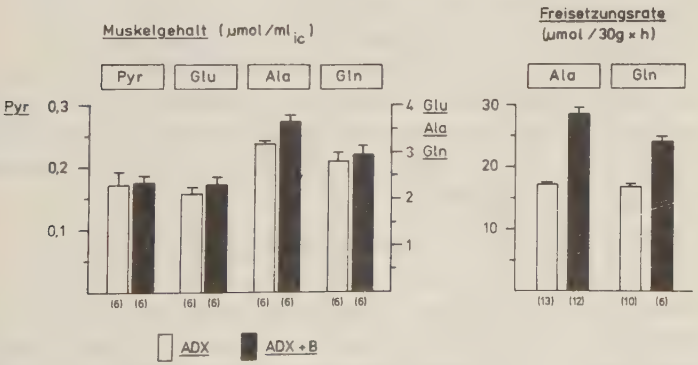


Abb.46: Signifikant unterschiedliche Bildungs- und Effluxraten von Alanin und Glutamin bei weitgehend konstanter Pyruvat- und Glutamatkonzentration im M. gastrocnemius 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und 3 - 4 h nach Betamethasoninjektion (ADX + B: 500 µg/100 g KG). Mittelwerte und s_{EM}.

Offenbar befindet sich das Transaminasensystem der Muskulatur in einem "Fließgleichgewicht", das durch Zu- oder Abnahme der Bildungs- und Effluxraten von Alanin und Glutamin aufrechterhalten wird. Meßbar erhöhte stationäre Konzentrationen der Zwischenprodukte treten in diesem Falle nicht auf. Durch ihre kombinierte Wirkung auf die Verfügbarkeit von Pyruvat, Glutamat und NH_3-liefernden Aminosäuren scheinen Glucocorticoide die Flußrate durch dieses System bevorzugt in Richtung Alanin und, geringer ausgeprägt, in Richtung Glutamin zu erhöhen; die entstehenden "Endprodukte" werden nur wenig akkumuliert und ganz überwiegend in den Extracellulärraum freigesetzt.

Einfluß einer artifiziellen Erhöhung der Verfügbarkeit von Pyruvat und verzweigtkettigen Aminosäuren auf die Alaninfreisetzung durch die Muskulatur andrenalektomierter Ratten

Um die Ursache der geringen Alaninbildung durch die Muskulatur adrenalektomierter Ratten experimentell zu überprüfen, wurden Perfusionen mit Pyruvat-, Lactat- und Aminosäurenzusätzen zum Medium durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche zeigen, daß sowohl die Steigerung der Pyruvatverfügbarkeit als auch das Angebot verzweigtkettiger Aminosäuren die Alaninfreisetzung normalisiert oder über Normalwerte hinaus steigert. Dabei ergeben sich zum Teil erhebliche qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Substraten, die Rückschlüsse auf die physiologische Regulation der de-novo-Alaninsynthese erlauben.

Effekte von Pyruvat- und Lactatzusätzen zum Perfusionsmedium

Erhöhung der Pyruvat- und Lactatkonzentration im Perfusionsmedium führt, wie im folgenden für Normaltiere noch näher gezeigt wird, zu einer Aufnahme und Utilisation dieser Substrate durch die Muskulatur. Dabei scheint Lactat zum

überwiegenden Teil (etwa 6o - 7o %) oxidiert zu werden, während ein hoher Prozentsatz des aufgenommenen Pyruvats (etwa 6o %) als Lactat wieder an das Medium abgegeben wird. Die höhere Oxidationsrate des Lactats kann im Zusammenhang mit der signifikanten Steigerung der Pyruvatkonzentration im Muskel gesehen werden, die möglicherweise eine Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase auslöst (5o7, 5o8). Unter Pyruvatzusatz zum Perfusat bleibt überraschenderweise eine intracelluläre Akkumulation dieses Substrates aus.

Beide Substrate haben, unabhängig von ihrem unterschiedlichen Einfluß auf die Pyruvatkonzentration im Muskel, einen gleichwertigen stimulierenden Effekt auf die Alaninfreisetzung (Abb.47). Die Mehrbildung entspricht etwa 6 - 7 % der während der Perfusion aufgenommenen Pyruvat- oder Lactatmenge.

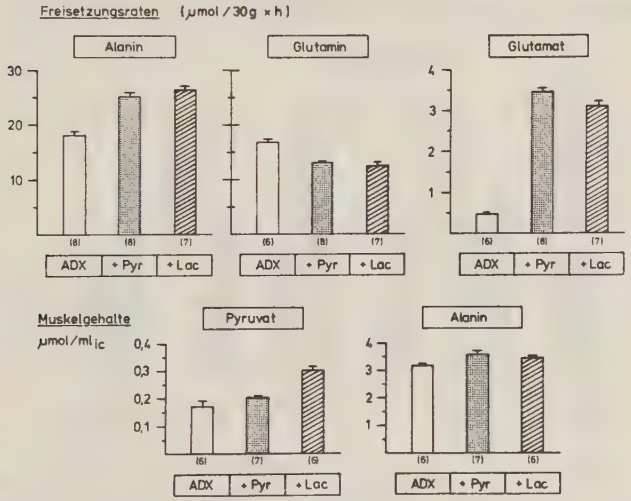


Abb.47: Effekte von Pyruvat- und Lactatzusätzen auf die Alaninfreisetzung aus der Muskulatur 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten (ADX).
Pyruvatzusätze (+Pyr): Erhöhung der Perfusatkonzentration um je 1 mmol/l zu Beginn des Versuches und nach 2o und 4o Minuten Perfusionsdauer.
Lactatzusätze (+Lac): wie oben, jedoch Erhöhung der Perfusatkonzentration um je 3 mmol/l.

Effekte von Leucin- und Valinzusätzen zum Perfusionsmedium

Zusätze der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin (5 mmol/l) und Valin (5 mmol/l) zum Perfusionsmedium bewirken, im Gegensatz zu Pyruvat- und Lactatangeboten und in Übereinstimmung mit der Situation nach Glucocorticoidapplikation, sowohl eine Steigerung der Alanin- als auch der Glutaminfreisetzung (Abb.5o). Als Substrate der im Muskel vorhandenen "branched-chain amino acid"-Aminotransferase I (5o9-513, 8o) erhöhen sie die Glutamatverfügbarkeit; die entstehenden α-Ketosäuren (siehe Abb.34) können weiter abgebaut und als Acetyl-CoA (aus Leucin) oder Succinyl-CoA (aus Valin) in den Citratzyklus eingeschleust werden (514, 515, 167, 172, 492, 5o5, 5o6).

Die Steigerungsraten der Alanin- und Glutaminfreisetzung sind für beide Aminosäuren grundsätzlich unterschiedlich. Während Leucin eine ausgesprochen glutaminbetonte Steigerung der Synthese- und Freisetzungsraten bewirkt, steht beim Valin die Alaninbildung im Vordergrund.

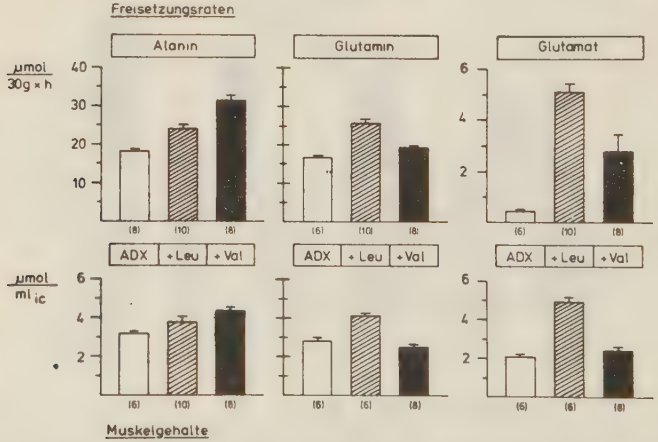


Abb.5o: Stimulation der Alanin- und Glutaminsynthese und -freisetzung durch Leucin- oder Valinzusatz (5 mmol/l) zum Perfusionsmedium. Perfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten (ADX). Mittelwerte und s_{EM}.

Ein geringerer Leucineinfluß auf die Alaninfreisetzung wurde kürzlich auch im Zusammenhang mit Untersuchungen an Herzmuskulatur (516) und am M. soleus und M. extensor digitorum longus der Ratte (517) beschrieben.
Die Differenz zwischen beiden Aminosäuren ergibt sich aus ihrer unterschiedlichen Wirkung auf die Pyruvatverfügbarkeit des Muskels. Unter Leucinzusatz kommt es zu einer erheblichen Pyruvatverarmung der Muskulatur, die sich sowohl in der Abnahme des Intracellulärgehaltes als auch in der Zunahme der Pyruvatextraktion aus dem Medium manifestiert (Tab.16).

	ADX	+ Leu	+ Val
Pyruvataufnahme µmol/30g×h	(12) 2.34 (± 0.25)	(10) 7.17 (± 0.54)	(8) 1.50 (± 0.69)
Lactatfreisetzung µmol/30g×h	(12) 79.31 (± 6.01)	(10) 79.38 (±10.29)	(8) 94.08 (± 15.60)
Pyruvat im Muskel µmol/ml$_{ic}$	(6) 0.173 (± 0.020)	(10) 0.047 (± 0.009)	(8) 0.094 (± 0.009)
Lactat im Muskel µmol/ml$_{ic}$	(6) 2.73 (± 0.24)	(10) 2.96 (± 0.22)	(8) 2.85 (± 0.17)

Tab.16: Signifikant unterschiedliche Raten der Pyruvatutilisation während Hinterkörperperfusionen mit Leucin- und Valinzusatz (5 mmol/l) zum Medium. 24 h-gehungerte adrenalektomierte Ratten (ADX).
Während unter Leucinzusatz der Pyruvatgehalt des Systems ausgeschöpft wird, bleibt er unter Valinzusatz - trotz erheblicher Steigerung der Alaninsynthese - weitgehend stabil. Mittelwerte und s_{EM}.

Die Alaninbildung wird unter diesen Bedingungen durch einen Pyruvatmangel limitiert; Erhöhung des Pyruvatangebotes im Medium (auf 0.75 mmol/l) ist von einer hohen Steigerung der Alaninbildung (auf 32.76 ($\pm$ 0.33) µmol/3o g Muskel x h, n = 2) gefolgt. Ein gleicher Effekt kann durch Glucocorticoidvorbehandlung der adrenalektomierten Ratten erzielt werden.

Unter Valinzusatz bleibt eine vergleichbare Pyruvatverarmung aus; analog dazu wird die Alaninsynthese und -freisetzung hochsignifikant gesteigert. Da beide Aminosäuren das gleiche Transaminase- und Dehydrogenasesystem benutzen (5o9, 511, 514), muß der Unterschied im weiteren Stoffwechsel dieser Aminosäuren begründet sein. Aufgrund der dargestellten Ergebnisse ist anzunehmen, daß Valin neben der Aminogruppe auch einen nicht unbedeutenden Anteil des Pyruvatskeletts für die Alaninsynthese bereitstellt. Da ein Teil des Kohlenstoffskeletts von Valin als Succinyl-CoA in den Citratzyklus einmündet (518), erfolgt die Transformation zu Pyruvat vermutlich auf der Stufe des Malats oder Oxalacetats (Abb. 51).

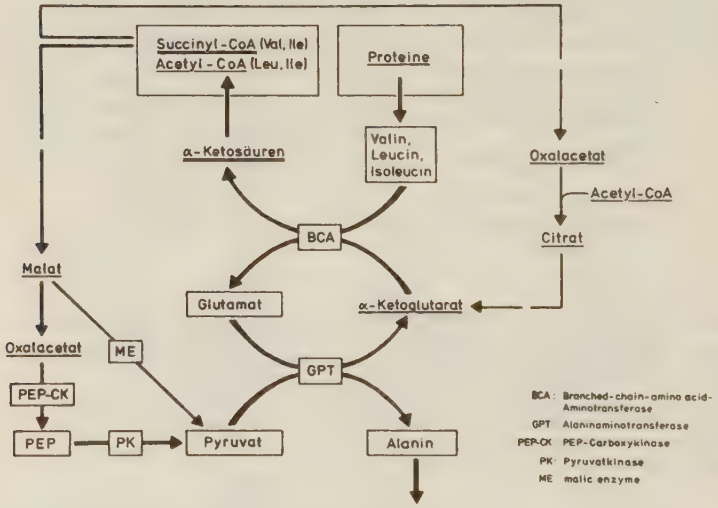


Abb.51: Verbindungen zwischen dem Stoffwechsel der verzweigtkettigen Aminosäuren und der Glutamat- und Alaninbildung in proteinkatabolen Situationen.
Die Aminosäuren Valin und Isoleucin können, aufgrund der anaplerotischen Funktion des beim Abbau entstehenden Succinyl-CoA (C_4), auch das Kohlenstoffskelett von Alanin (C_3) und einen Teil des Glutamat- bzw. Glutamingerüstes (C_5) bilden. Welchem Weg die quantitativ größere Bedeutung zukommt, ist Gegenstand einer Kontroverse (471, 492, 5o5, 569, 524). Die eigenen Befunde sind ein deutlicher Hinweis, daß der Weg der Pyruvatbildung bevorzugt ist.

Die erforderlichen Enzyme NADP-abhängige Malatdehydrogenase ("malic enzyme", EC 1.1.1.4o) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (EC 4.1.1.32; Pyruvatbildung in Kombination mit der Pyruvatkinasereaktion) sind in einer Aktivität von rund 0.5 - 1 µmol/min x g (37° C) in "fast-twitch"-Muskeln enthalten (519-525, 52).
Jüngste Befunde der Arbeitsgruppe von K. SNELL sprechen dafür, daß der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase für die valinstimulierte Alaninbildung die größere Bedeutung zukommt; nach Hemmung dieses Enzyms wird die Alaninfreisetzung durch das Diaphragma gehungerter Ratten stark reduziert (82, 49o, 469). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die Aktivität der PEP-Carboxykinase (im Gegensatz zum malic enzyme) im Hungerzustand, ähnlich wie in der Leber (2o6), auch in der Muskulatur ansteigt (47o, 525).
Versuche mit Zusatz von (U-^{14}C)-Valin zum Medium zeigten, daß während der Perfusionen tatsächlich eine Transformation von Valinkohlenstoff zu Pyruvat eintritt (Abb.52). Der Prozeß scheint primär konzentrationsabhängig zu sein; Adrenalektomie und kurzfristige Betamethasonvorbehandlung beeinflussen die spezifische Aktivität des freigesetzten Alanins nicht.

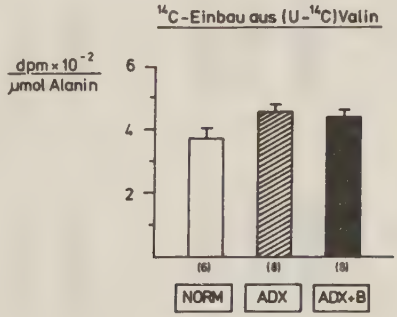


Abb.52: Spezifische Aktivität des während Perfusionen mit Valin (5 mmol/l) und (U-^{14}C)-Valin (2o µCi) freigesetzten Alanins.
24 h-gehungerte normale (NORM) und adrenalektomierte Ratten ohne (ADX) und mit (ADX + B) einmaliger Betamethasonvorbehandlung (5oo µg/1oo g KG, 3 - 4 h vor der Perfusion). Mittelwerte und s_{EM}.

Ähnlich wie in Versuchen mit Pyruvat- und Lactatzusatz, führt Betamethasonvorbehandlung der Ratten auch bei Perfusionen mit Aminosäurenzusätzen zu einem additiven Effekt auf die Alanin- und Glutaminfreisetzung.
Der Vergleich der Betamethasonwirkung auf die Alanin- und Glutaminsynthese mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungsreihe ergibt Parallelen sowohl zu den Valin- als auch zu den Leucinversuchen (Abb.53). Hinsichtlich der bevorzugten Alaninbildung und fehlenden Ausschöpfung des Pyruvatgehaltes kann der Effekt der Glucocorticoide als "valinähnlich", hinsichtlich der gleichzeitigen Steigerung der Glutaminbildung als "leucinähnlich" bezeichnet werden. Die Befunde sind ein weiterer Hinweis darauf, daß diese Hormone durch Erhöhung der intracellulären Aminosäurenverfügbarkeit die Alanin- und Glutaminsynthese des Muskels stimulieren. Der vermehrten Bereitstellung pyruvat- und glutamatbildender Aminosäuren, wie Valin oder Isoleucin, kommt dabei wahrscheinlich eine entscheidende Bedeutung zu.

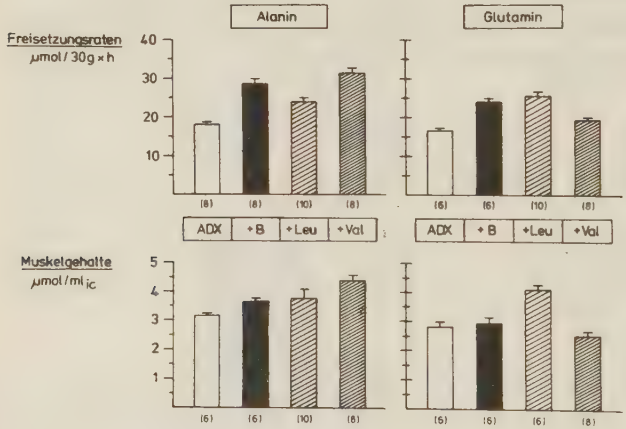


Abb.53: Vergleich der glucocorticoidbedingten Änderungen der Alanin- und Glutaminbildung (ADX + B) mit den Befunden nach Aminosäurenzusatz (+ Leu/+ Val) zum Perfusionsmedium. Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten. Mittelwerte und s_{EM}.

Zusammenfassung

Die verminderte Alaninfreisetzung adrenalektomierter Ratten ist mit einer herabgesetzten Pyruvat- und Aminosäurenverfügbarkeit der Muskulatur zu korrelieren. Glucocorticoidsubstitution gleicht diesen Mangel aus. Eine ähnliche Wirkung hat das artifizielle Angebot von Pyruvat, Lactat oder glutamatbildenden Aminosäuren im Perfusionsmedium.
Der Vergleich der substrat- und glucocorticoidbedingten Änderungen der Alanin- und Glutaminbildung läßt darauf schließen, daß die vermehrte Bereitstellung glutamat- und pyruvatbildender Aminosäuren (bei gleichzeitiger Einschränkung der Pyruvatoxidation) eine wesentliche Grundlage für die Zunahme der de-novo-Synthese von Alanin und Glutamin nach Glucocorticoidapplikation ist.

4. Der Einfluß der Insulin- und Alaninkonzentration im Blut auf die Alaninfreisetzung durch die Muskulatur

Während die normale Rate der Alanin- und Glutaminfreisetzung im Futter- und Hungerzustand an die Anwesenheit von Glucocorticoiden gebunden ist, tritt die typische Zunahme der Alaninfreisetzung nach Nahrungsentzug auch bei Fehlen dieser Hormone ein (siehe Abb.33). Der nahrungsabhängige Anpassungsprozeß selbst ist daher als Ausdruck der Zu- oder Abnahme von Faktoren zu werten, die neben Glucocorticoiden die Alaninbildung und -abgabe durch die Muskulatur beeinflussen. Wie die folgenden Befunde zeigen, kommt den Veränderungen der Insulin- und Alaninkonzentration im Blut offenbar erhebliche Bedeutung zu. In Übereinstimmung mit der Situation unter Nahrungszufuhr in vivo, wird die Alaninfreisetzung aus der perfundierten Muskulatur sowohl durch Insulinzusatz zum Medium als auch durch Erhöhung der extracellulären Alaninkonzentration signifikant vermindert.

Abhängigkeit der Alaninfreisetzung von der Insulinkonzentration im Perfusat

Ein senkender Insulineffekt auf die Alaninfreisetzung ist in verschiedenen unabhängigen Untersuchungsreihen nachzuweisen (Abb.54). Die Insulinwirkung ist um so stärker ausgeprägt, je höher die Freisetzungsrate der insulinfreien Kontrollperfusionen ist. So wird besonders deutlich die betamethason- (ADX + B) und lactatstimulierte (ADX + Lac/ ADX + B + Lac) Alaninfreisetzung reduziert. Als wichtiger Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ergibt sich, daß der steigernde Effekt des Lactats vollständig, der des Glucocorticoids jedoch nur partiell aufgehoben wird. Vergleicht man die Differenz zwischen den einander zuzuordnenden Versuchen (ADX- gegenüber ADX + B-Versuchen), so zeigt sich, daß die Wirkung der Betamethasonvorbehandlung auch unter Insulineinfluß erhalten bleibt; Insulin "verlagert" den Freisetzungsbereich insgesamt auf ein niedrigeres Niveau. Die jeweils zu messende absolute Freisetzungsrate kann als Ergebnis des Zusammenwirkens beider Hormone angesehen werden. In Bezug auf die Verhältnisse in vivo wäre die Rate der Alaninfreisetzung im Futterzustand als insulinbetont, die im Hungerzustand als glucocorticoidbetont zu bezeichnen.
Der alaninsenkende Effekt des Insulins kann auf den Einfluß des Hormons auf die Aminosäurenaufnahme (612,435,437), die Proteinsynthese (190,99) und den Pyruvatumsatz der Muskulatur (187,188,468) zurückgeführt werden. Unter seiner Wirkung wird die Netto-Effluxrate des Alanins herabgesetzt (ein Effekt, der besonders bei hoher basaler Freisetzungsrate deutlich wird); der Substratfluß durch die Pyruvatdehydrogenasereaktion wird erhöht und gleichzeitig die Verfügbarkeit glutamat- und pyruvatbildender Aminosäuren durch vermehrte Bindung im Muskelprotein erniedrigt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß in Perfusionsexperimenten mit Insulinzusatz der Anteil von Glucosekohlenstoff im freigesetzten Alanin zunimmt (81).
Das zeitlich frühe Auftreten des Insulineffektes auf die Alaninfreisetzung (Abb.55) und der Nachweis einer Alanin-

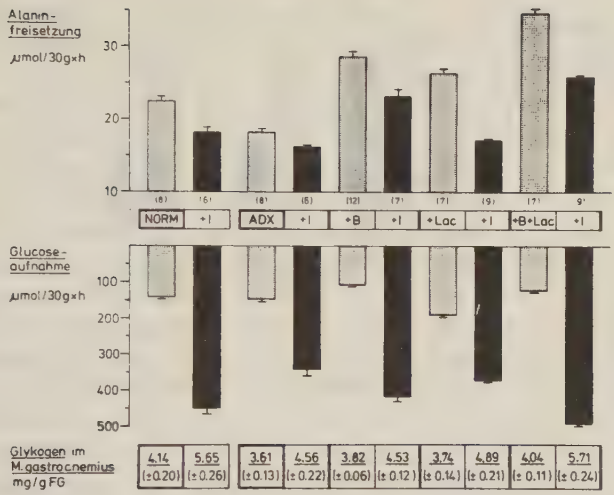


Abb.54: Insulinwirkung auf die Alaninfreisetzung, Glucoseaufnahme und Glykogendeposition während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter normaler (NORM) und adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit (ADX + B) einmaliger Betamethasonvorbehandlung in vivo (5oo µg/1oo g KG, 3 - 4 h vor dem Versuch).
Insulinzusatz (+ I) erfolgte in den entsprechenden Versuchsreihen zu Beginn der Perfusion in einer Dosis von O.5 mU/ml (NORM) oder 1 mU/ml (ADX). Die Lactatzusätze (+ Lac) entsprachen den Versuchen in Abb.47. Mittelwerte und s_{EM}.

akkumulation im Muskelzellwasser unter besonderen Versuchsbedingungen (Abb.56) sprechen dafür, daß der während einstündiger Perfusionen zu beobachtende Effekt vorwiegend auf eine Veränderung des Membrantransportes zurückzuführen ist. Veränderungen des Proteinumsatzes scheinen erst nach längerer Perfusionsdauer manifest zu werden (99). Ob bei der Regulation des Alanintransports primär eine erhöhte Wiederaufnahme der freigesetzten Aminosäure in die Muskelfaser oder eine Hemmung des Effluxes erfolgt, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden.

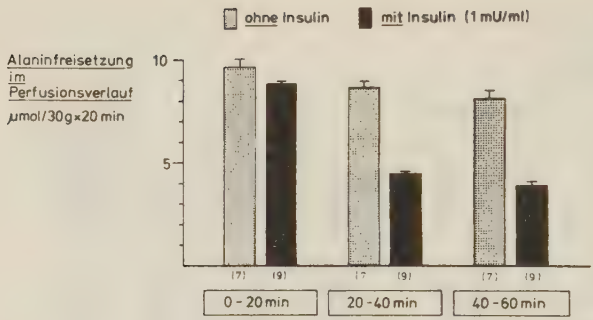


Abb.55: Zeitliches Auftreten des Insulineffektes auf die lactatstimulierte Alaninfreisetzung während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten.
Die lag-Phase von etwa 2o Minuten entspricht dem Zeitraum, der auch für den Anstieg der Glykogensynthese des Muskels beobachtet wurde (526); die Aktivierung des Glucosetransports verläuft dagegen sehr viel rascher (3o sec bis wenige Minuten: 526, 527). Der Anstieg der Proteinsynthese und der Rückgang der Abbaurate werden wahrscheinlich erst nach einer lag-Phase von etwa 6o Minuten wirksam (99). Mittelwerte und s_{EM}.

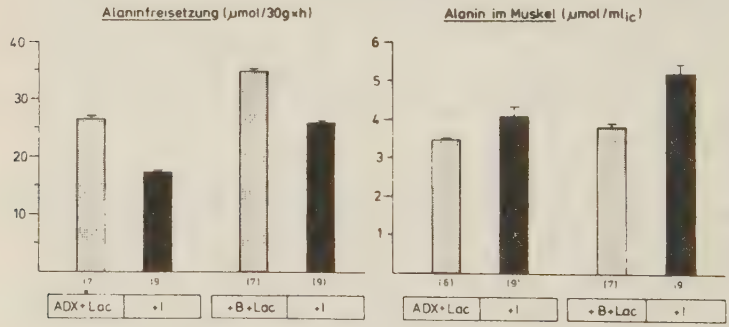


Abb.56: Hemmung der Alaninfreisetzung mit begleitender Alaninakkumulation im M. gastrocnemius während Perfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit (ADX + B) einmaliger Betamethasonvorbehandlung (5oo µg/1oo g KG, 3 - 4 h vor der Perfusion). Mittelwerte und s_{EM}.
Die Alaninakkumulation im Muskel kann als Ausdruck der noch nicht eingetretenen Synchronisation zwischen Aminosäurentransport- und Proteinsyntheseaktivierung gewertet werden.

Abhängigkeit der Alaninfreisetzung von der extracellulären Alaninkonzentration

Als weiterer Faktor, der die Höhe der Alaninfreisetzung aus der Muskulatur in vivo mitbestimmt, ist die extracelluläre Alaninkonzentration zu nennen. Sie unterliegt, wie bereits gezeigt wurde (Tab.9, Abb.31), erheblichen nahrungsabhängigen Schwankungen. Dabei scheint zwischen Blutkonzentration und der Freisetzungsrate aus dem Hinterkörper in vivo ein reziprokes Verhältnis zu bestehen (174, 175). Der Befund deutet darauf hin, daß die mit einer erhöhten Gluconeogeneserate der Leber verbundene Abnahme der Alaninkonzentration im Blut autoregulativ zu einer erhöhten Abgabe des Substrates aus der Muskulatur führt.
Die Abhängigkeit der Freisetzungsrate von der extracellulären Alaninkonzentration läßt sich in Perfusionsexperimenten sehr deutlich nachweisen. Im Verlaufe normaler Perfusionen, die ohne Alaninzusatz zum Medium durchgeführt werden, kommt es unter Anstieg der extracellulären Konzentration im Perfusat zu einem kontinuierlichen Rückgang der Freisetzungsrate (Tab.17); aufgrund der Konzentrationsverhältnisse dürften im übrigen die während der Untersuchung gemessenen Freisetzungsraten etwa den in vivo-Werten im Hungerzustand entsprechen (Konzentrationen in vivo: 0.180 ($\pm$ 0.009) µmol/ml (n = 9) für die Aorta und 0.211 ($\pm$ 0.009) µmol/ml (n = 9) für die V. cava inf.).
Eine artifizielle Erhöhung der Alaninkonzentration im Medium zu Beginn der Versuche führt zu einer signifikant reduzierten Abgabe der Aminosäure; bei Überschreiten eines Konzentrationsbereiches von etwa 0.500 - 0.600 µmol/l kommt es zu einer Alaninaufnahme durch die Muskulatur (Abb.57). Die Aufnahme erfolgt gegen einen intra-extracellulären Konzentrationsgradienten von etwa 3.

	0 - 20 min	20 - 40 min	40 - 60 min
Alaninkonzentration im Perfusat (µmol/ml)	(13) 0.156 (± 0.006)	(13) 0.247 (± 0.009)	(13) 0.319 (± 0.011)
Alaninfreisetzung (µmol/30g × 20min)	(13) 9.62 (± 0.49)	(13) 6.95 (± 0.64)	(13) 5.48 (± 0.30)

Tab.17: Kinetik der Alaninfreisetzung im Verlauf von Normalperfusionen (ohne Alaninzusatz zum Perfusionsmedium). Mittelwerte und s_{EM}.

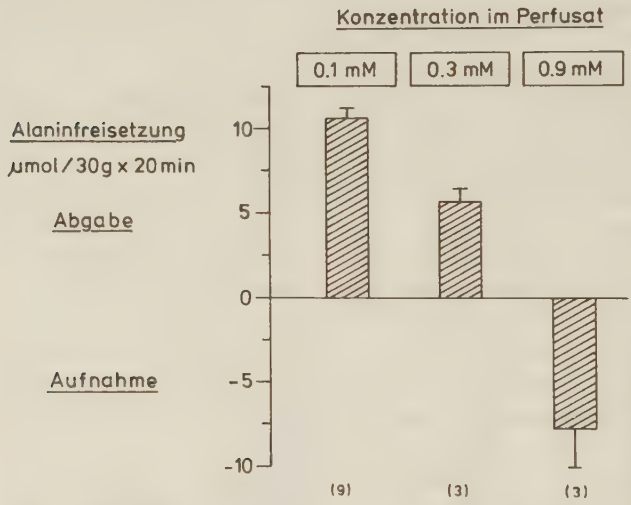


Abb.57: Abhängigkeit der Alaninfreisetzung von der primären Alaninkonzentration im Perfusionsmedium. Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter intakter Ratten (NORM). Mittelwerte und s_{EM}.

Nach Betamethasonvorbehandlung der Ratten ist die Konzentrationsabhängigkeit der Alaninfreisetzung weniger deutlich

ausgeprägt. Trotz erhöhter Alaninkonzentrationen in der Extracellulärflüssigkeit ist die Freisetzungsrate gegenüber Kontrolltieren signifikant gesteigert und verläuft während der Perfusionen weitgehend linear. Das unterschiedliche Verhalten ist nicht mit dem Anstieg der intracellulären Alaninkonzentration nach Glucocorticoidgabe zu erklären, sondern muß als Ausdruck einer Veränderung des Aminosäurentransports gewertet werden (Tab.18).

	NORM	ADX + BL
Alaninfreisetzung µmol/30g × h	(12) 21.55 (± 0.78)	(6) 33.37 (± 1.41)
Alanin im Muskel µmol/ml$_{ic}$	(12) 3.990 (±0.144)	(6) 3.794 (± 0.127)
Alanin in der Extracellulärflüssigkeit µmol/ml$_{ec}$	(12) 0.379 (± 0.010)	(6) 0.515 (±0.027)
Gradient ic/ec	10.5	7.4

Tab.18: Alaninfreisetzung während Perfusionen 24 h-gehungerter normaler (NORM) und 5 Tage mit Betamethason substituierter adrenalektomierter Ratten (ADX + BL: 2 x 1oo µg/ 1oo g KG x d).
Trotz gleichen intracellulären Alaningehaltes und signifikant höherer Alaninkonzentration im Extracellulärraum ist die Alaninfreisetzung aus der Muskulatur nach Betamethasonvorbehandlung stark erhöht. Mittelwerte und s_{EM}.

Zusammenfassung

Neben den Glucocorticoiden haben Insulin und die extracelluläre Alaninkonzentration modulierende Wirkung auf die Alaninfreisetzung aus dem isolierten Hinterkörper. Insulin senkt die glucocorticoidstimulierte Alaninfreisetzung ohne jedoch den Glucocorticoideffekt aufzuheben. Die verminderte Freisetzungsrate im Futterzustand in vivo kann als Ausdruck

der Insulinwirkung auf den Aminosäurentransport und den Proteinumsatz gewertet werden. Unterstützend wirkt dabei der Anstieg der Alaninkonzentration in der Extracellulärflüssigkeit, der den Alaninefflux herabsetzt und zur Aufnahme der Aminosäure in die Muskulatur führt.
Die Abnahme der Insulin- und Alaninkonzentration im Blut, verbunden mit einer Änderung der intracellulären Pyruvatverfügbarkeit, kann zugleich als "Trigger" für die Zunahme der Alaninfreisetzung nach Nahrungsentzug angesehen werden. Die resultierende Freisetzungsrate wird bestimmt durch die Verfügbarkeit glutamat- und pyruvatbildender Aminosäuren; sie ist abhängig von der Anwesenheit der Glucocorticoide.

5. Untersuchungen zur regulativen Bedeutung des "Glucose-Alanin-Zyklus" für die Alaninfreisetzung aus der Skelettmuskulatur der hungernden intakten Ratte

Das von P. FELIG und Mitarbeitern entwickelte Konzept des "Glucose-Alanin-Zyklus" (64, 68, 69) setzt die Regulation der Alaninsynthese und -abgabe durch die Muskulatur in direkte Beziehung zur Verfügbarkeit von Glucosekohlenstoff. Als Argumente für dieses Konzept werden die bei Untersuchungen am Menschen festzustellenden positiven Korrelationen der Alaninfreisetzung mit einer gesteigerten Glucoseaufnahme und Pyruvatbildung unter Muskelarbeit (528-532, 179) oder erhöhten Pyruvat- und Lactatkonzentrationen im Blut (533, 534) angeführt.
Die Existenz des Zyklus, sichtbar am Einbau von radioaktiv markiertem Glucosekohlenstoff in Alanin, kann nicht bezweifelt werden. Eigene Untersuchungen, die am Ende der Arbeit dargestellt werden, und Ergebnisse anderer Autoren (78, 81, 311) zeigen, daß ein bedeutender Anteil des während der Perfusionen freigesetzten Alanins aus der aufgenommenen Glucose entsteht. Die Möglichkeit einer Regulation durch unterschiedliche Aufnahmeraten von Glucosekohlenstoff ist daher nicht auszuschließen; sie würde bedeuten, daß unter

normalen Bedingungen die Pyruvatverfügbarkeit im Muskelzellwasser die limitierende Größe der de-novo-Alaninsynthese darstellt.
Wie die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen zeigen, ist das offenbar nicht der Fall. Im Gegensatz zur adrenalektomierten Ratte, bei der sich (neben der geringeren Aminosäurenbereitstellung) Hinweise auf eine verminderte intracelluläre Pyruvatverfügbarkeit ergaben, ist die normale Rate der Alaninfreisetzung gehungerter intakter Ratten durch einseitige Änderung der Glucose-, Lactat- oder Pyruvatutilisation nur in sehr geringem Umfang zu beeinflussen.

5.1 Konzentrationsabhängige Glucoseutilisation der Muskulatur und Modulation der Alaninfreisetzung

Die Rate der Glucoseaufnahme des insulinfrei perfundierten Hinterkörpers ist abhängig von der extracellulären Glucosekonzentration. Die Aufnahme zeigt die für den Carriertransport typische Sättigungskinetik (182, 535); während sie im Konzentrationsbereich von 2 - 22 mmol/l steil und signifikant ansteigt, hat die weitere Erhöhung der Perfusatkonzentration auf 44 mmol/l nur noch einen geringen Effekt (Abb.58). Die Lactatfreisetzung während der Perfusionen entspricht weitgehend der Zunahme der Glucoseutilisation; die Unterschiede sind jedoch statistisch weniger deutlich ausgeprägt. Unter allen Versuchsbedingungen kommt es zu einer leichten Pyruvataufnahme; die Glykogenkonzentration des M. gastrocnemius bleibt von der Höhe der Glucoseaufnahme unbeeinflußt.
Den signifikanten Änderungen der Glucoseaufnahme und Glykolyserate im physiologischen Bereich der Glucosekonzentrationen (2 - 11 mmol/l) ist kein entsprechender, signifikanter Anstieg der Alaninfreisetzung zuzuordnen. Eine leichte, jedoch signifikante Steigerung der Alaninabgabe ist während Perfusionen mit hohen Glucosekonzentrationen nachzuweisen. Möglicherweise kommt es durch "hyperosmolare"

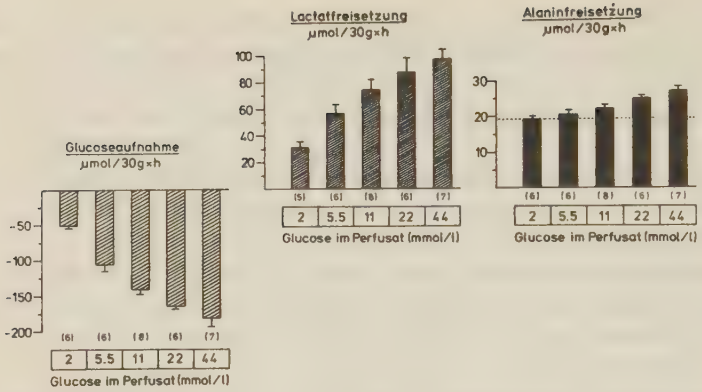


Abb.58: Glucoseaufnahme, Lactatbildung und Alaninfreisetzung in Abhängigkeit von der extracellulären Glucosekonzentration während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter normaler Ratten (NORM). Mittelwerte und s_{EM}.

Perfusionsbedingungen (der Wassergehalt des Muskelgewebes wird während dieser Versuche von 75.2 % auf 72.9 - 71.8 % erniedrigt) zu einer geringen Änderung des Membrantransportes oder des intracellulären Proteinumsatzes. Ein klarer Hinweis auf die Regulation der Alaninfreisetzung im Sinne eines "Glucose-Alanin-Zyklus" ist aus diesen Versuchen nicht abzuleiten.

Die nähere Analyse der Glucoseaufnahmekinetik ergibt interessante Unterschiede zu vergleichbaren Perfusionsexperimenten, die von M. BERGER und Mitarbeitern unter Zusatz maximal wirksamer Insulindosen (12.5 mU/ml) durchgeführt wurden (126): sowohl die apparente MICHAELIS-Konstante K_M der Glucoseaufnahme (6.6 mmol/l ohne und 13 mmol/l mit Insulin) als auch die maximale Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} (0.12 µmol/min x g ohne und 0.84 µmol/min x g mit Insulin) sind vermindert (Abb.59).

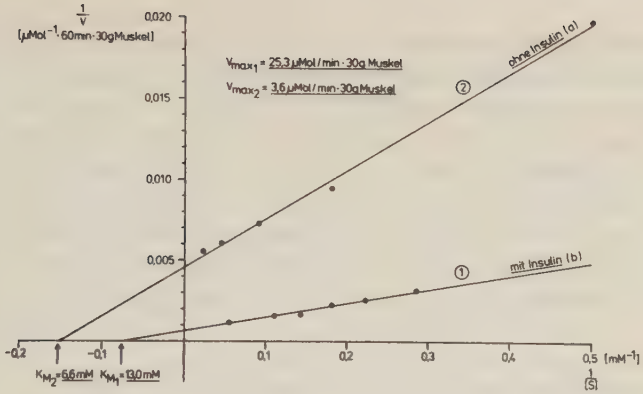


Abb.59: Kinetik der Glucoseaufnahme des Rattenhinterkörpers in Perfusionen mit und ohne Insulinzusatz (Darstellung nach Lineweaver-Burk).
a) Eigene Befunde (siehe Abb.58) ohne Insulinzusatz zum Perfusat;
b) Diagramm nach Daten von M. BERGER und Mitarbeitern (126); 48 h-gehungerte Ratten, 12.5 mU/ml Insulinzusatz zum Perfusat.

Der in den Versuchen ohne Insulinzusatz ermittelte K_M-Wert stimmt mit Daten überein, die am perfundierten Rattenherzen ermittelt wurden (421), liegt jedoch niedriger als in einer anderen Untersuchung mit dem isolierten Hinterkörper (536). Ein Anstieg des K_M- und V_{max}-Wertes unter Insulineinfluß wird, analog zu den dargestellten Befunden, auch aus in-vivo-Experimenten abgeleitet, in denen die Kinetik der Glucoseaufnahme in den M. pectoralis major der Ratte gemessen wurde (537).
Ermittelt man aus den kinetischen Daten (Abb.59) die aktuellen Aufnahmeraten für den Bereich physiologischer Blutglucosekonzentrationen, so zeigt sich, daß unter Anwesenheit von Insulin schon geringe Konzentrationsänderungen zu einer wirkungsvollen Zu- oder Abnahme der Aufnahmegeschwindigkeit führen (Abb.6o). Unter Abwesenheit von Insulin reagiert das System dagegen sehr viel träger auf Änderungen der

extracellulären Glucosekonzentration; es trägt dadurch zur Stabilisierung des Blutglucosegehaltes im Stadium verminderter Glucosereserven bei.

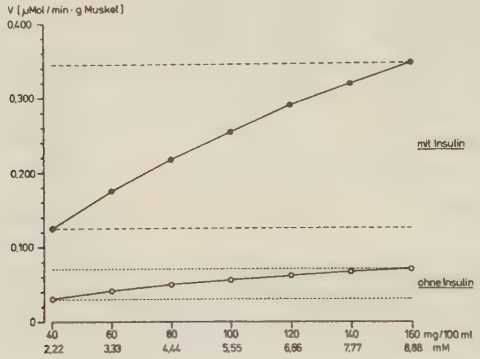
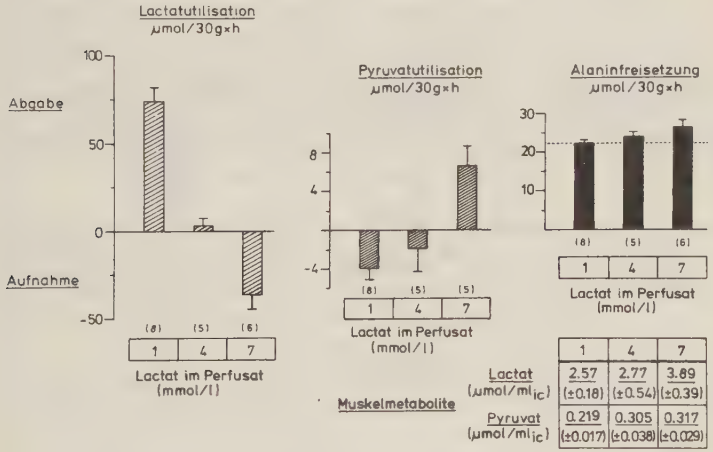


Abb.6o: Glucoseaufnahme durch die Muskulatur 24 h-gehungerter Ratten in Abhängigkeit von Änderungen der Glucosekonzentration im Blut unter Anwesenheit von Insulin (12.5 mU/ml) und ohne Insulin (nach Daten in Abb.59 erstellt).

5.2 Alaninfreisetzung in Situationen mit erhöhten Lactat- und Pyruvatkonzentrationen im Perfusionsmedium

Wie bereits im Zusammenhang mit den Untersuchungen an adrenalektomierten Ratten dargestellt wurde, reagiert die perfundierte Muskulatur autoregulativ auf Erhöhungen der extracellulären Lactat- und Pyruvatkonzentration mit einer erhöhten Aufnahme- und Umsatzrate der Substrate. Ähnliche Bedingungen scheinen auch für den Menschen zu gelten; eine Lactataufnahme bei ansteigendem Blutspiegel wurde sowohl für die ruhende (538) als auch für die arbeitende Muskulatur (539, 54o) beschrieben. Bei artifizieller Pyruvatbelastung (Pyruvatinfusion in die A. brachialis) kommt es zu einer raschen Utilisation des Substrates durch das Muskelgewebe (534).

Während in Perfusionen ohne Lactatzusatz zum Medium (etwa 1 mmol/l Lactat diffundiert primär aus den zugesetzten Erythrocyten) eine kontinuierliche Lactatfreisetzung durch die Muskulatur erfolgt, wird diese aufgehoben bei Steigerung der Anfangskonzentration auf etwa 4 mmol/l (3 mmol/l Lactatzusatz zum Perfusat). Nach Überschreiten dieses Schwellenwertes,der in vivo wahrscheinlich niedriger liegt, erfolgt eine Lactataufnahme,deren Rate sich konzentrationsabhängig steigern läßt (Perfusionen mit 6 mmol/l Lactatzusatz) (Abb.61).
Mit der quantitativ bedeutsamen und signifikanten Zunahme der Lactatutilisation, die zu einem Anstieg des intracellulären Pyruvatgehaltes führt, ist nur ein geringer Anstieg der Alaninfreisetzung verbunden.



Muskelmetabolite

	1	4	7
Lactat (µmol/ml$_{IC}$)	2.57 (±0.18)	2.77 (±0.54)	3.89 (±0.39)
Pyruvat (µmol/ml$_{IC}$)	0.219 (±0.017)	0.305 (±0.038)	0.317 (±0.029)

Abb.61: Beziehung zwischen konzentrationsabhängiger Lactatutilisation und Alaninfreisetzung während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter intakter Ratten (NORM). Mittelwerte und s_{EM}.

Ein signifikanter Unterschied ergibt sich zwischen Perfusionen ohne und mit 6 mmol/l Lactatzusatz. Der Anstieg

beträgt 4 µmol/3o g Muskulatur x h gegenüber einer gleichzeitig erfolgenden Änderung der Lactatutilisation um 11o µmol/3o g Muskulatur x h.

Ähnliche Ergebnisse wie in Perfusionen mit Lactatzusätzen sind in Versuchen mit Erhöhung der Pyruvatkonzentration im Medium zu erhalten (Tab.19). Während es bei Experimenten ohne Pyruvatzusatz zu einer Senkung der Alaninfreisetzung gegenüber Standardperfusionen kommt, hat die ausgeprägte Zunahme der Utilisationsrate nach Zusatz von 3 mmol/l Pyruvat zum Medium nur eine geringe Änderung der Freisetzungsrate zur Folge. Eine grundlegende Modulationsmöglichkeit der Alaninbildung und -freisetzung durch einseitige Erhöhung der Pyruvatverfügbarkeit wird in diesen Versuchen nicht erkennbar.

Pyruvatzusatz zum Perfusat	Pyruvataufnahme µmol/30g×h	Alaninfreisetzung µmol/30g×h
0	(6) - 1.44 (± 1.22)	(6) 19.17 (± 0.70)
0.15 mmol/l	(8) - 3.86 (± 1.30)	(8) 22.36 (± 0.71)
3.00 mmol/l	(6) - 182.81 (± 4.73)	(6) 24.59 (± 0.24)

Tab.19: Konzentrationsabhängige Pyruvatutilisation und Alaninfreisetzung während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter intakter Ratten (NORM). Mittelwerte und s_{EM}.

Physiologische Bedeutung der Pyruvat- und Lactatutilisation der Muskulatur

Aufgrund der geringen Blutkonzentration in vivo ist die muskuläre Pyruvatutilisation quantitativ wahrscheinlich wenig bedeutsam; der Lactatutilisation wird dagegen nach Arbeitsbelastungen, bei denen Blut- und Gewebekonzentrationen über 2o mmol/l auftreten können (541, 561), eine Funktion im Rahmen des oxidativen Stoffwechsels (542), der Glykogenresynthese des Muskels (541, 522) und der Wiederherstellung der Lactathomöostase (539) zugeschrieben.
In den vorliegenden Untersuchungen bleibt der Glykogengehalt der ruhenden Muskulatur von den verschiedenen Raten der Lactatutilisation unbeeinflußt. Ebenso wird die Lactatkonzentration im Perfusat durch den Utilisationsprozeß nur relativ wenig gesenkt, ein Hinweis auf die Bedeutung der Leber (und anderer Organe) für die kurzfristige Normalisierung erhöhter Blutlactatkonzentrationen in vivo (Abb.62). Im Gegensatz dazu werden erhöhte intracelluläre Konzentrationen nach einer Arbeitsbelastung auch im in-vitro-Experiment sehr rasch abgebaut.

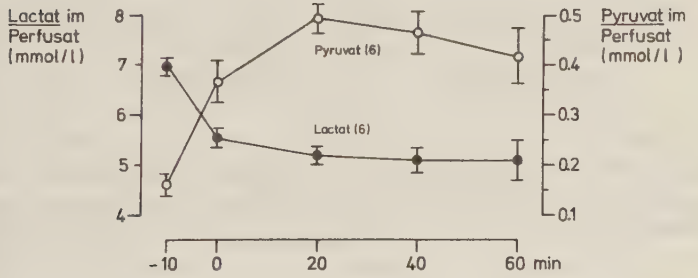
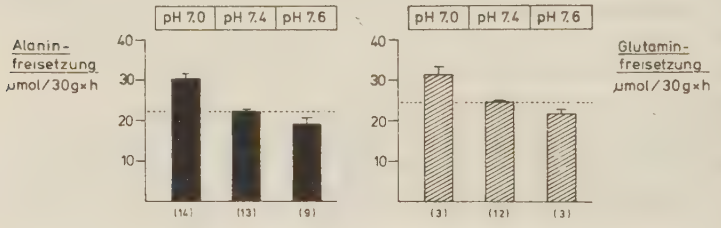


Abb.62: Zeitlicher Ablauf der Lactatutilisation durch den perfundierten Hinterkörper 24 h-gehungerter Ratten und Auswirkung auf die Lactat- und Pyruvatkonzentration im Perfusat. Der Utilisationsprozeß setzt sofort nach Anschluß des Präparates ein und kommt nach 2o - 3o Minuten zum Stillstand. Kontinuierliche, lineare Utilisationsraten können durch wiederholte Lactatzusätze während der Perfusion erzielt werden. Mittelwerte und s_E.

Steigerung der Alanin- und Glutaminfreisetzung der Muskulatur während acidotischer Zustände

Die mit erhöhten Lactatkonzentrationen bei Zuständen von Lactatacidose in vivo (533) in Zusammenhang gebrachte gesteigerte Alaninfreisetzung aus der Muskulatur ist wahrscheinlich eine Folge der pH-Verschiebung im Blut. Während Perfusionen unter Acidosebedingungen (Einstellung des pH-Wertes im Perfusat auf 7.o durch HCl-Zusätze oder Erhöhung des CO_2/HCO_3^--Verhältnisses) kommt es unter Rückgang der Glucoseaufnahme und Lactatfreisetzung zu einer signifikanten Steigerung des Alanin- und Glutamineffluxes aus der Muskulatur (Abb.63).



	pH 7.0	pH 7.4	pH 7.6
Glucoseaufnahme µmol/30g×h	(14) 114.24 (±8.35)	(13) 137.71 (±6.31)	(9) 323.08 (±19.11)
Lactatfreisetzung µmol/30g×h	(14) 32.12 (±10.74)	(13) 79.73 (±7.12)	(6) 258.27 (±21.11)

Abb.63: Veränderungen der Alanin-, Glutamin- und Lactatfreisetzung in Abhängigkeit vom pH-Wert des Perfusates während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter intakter Ratten (NORM). Mittelwerte und s_{EM}.

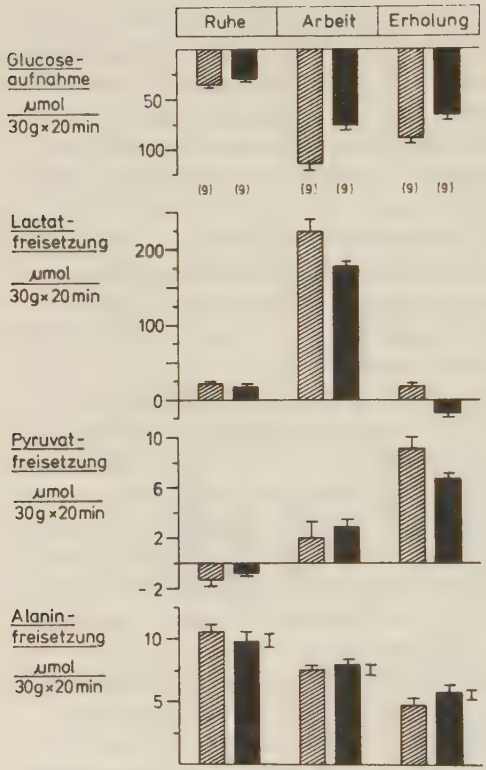
5.3 Kontraktionsabhängige Änderungen der Glucoseaufnahme, Lactatbildung und Pyruvatbereitstellung und ihre Beziehung zur Alaninfreisetzung

Die Kombination der bisher getrennt dargestellten Bedingungen (erhöhte Glucose-, Lactat- und Pyruvatverfügbarkeit) kennzeichnet die physiologische Stoffwechselsituation unter

Muskelarbeit und in der sich anschließenden Erholungsphase. Die bei Untersuchungen am Menschen zu beobachtenden charakteristischen Änderungen von Aufnahme- und Abgaberaten (543, 529, 53o) sind auch unter Arbeitsbelastung (Elektrostimulation der Nn. ischiadici unter Gewichtsbelastung der Füße) während isolierter Hinterkörperperfusionen untrainierter und sechs Wochen trainierter Ratten nachzuweisen (Abb.64).

Die Perfusionen dieser Versuchsreihen gliederten sich, entsprechend dem physiologischen Funktionszyklus der Muskulatur, in drei Abschnitte von je 2o Minuten Dauer: Ruhephase (O - 2o min), Arbeitsphase (2o - 4o min) und Erholungsphase (4o - 6o min) (siehe Abb.14).

Der Übergang von der Ruhe- zur Arbeitsphase (Beginn der Elektrostimulation nach 2o min Perfusionsdauer) ist gekennzeichnet durch einen hohen Anstieg der Glucoseaufnahme und Lactatfreisetzung; die initiale Pyruvatextraktion wird abgelöst durch eine Abgabe des Substrates an das Perfusionsmedium. Gleichzeitig wird die Sauerstoffaufnahme des Präparates verdoppelt (Tab.2o). Nach Beendigung der Kontraktionen wird die Steigerung der Glucoseaufnahme nur wenig reduziert; dieses auffallende und regelmäßige Merkmal der Erholungsphase, das auch an anderen Muskelpräparaten zu beobachten ist (544, 545), wird erstaunlicherweise im Zusammenhang mit Untersuchungen am Menschen nur selten beschrieben (529, 546). Wie der erhebliche Rückgang der Lactatfreisetzung, die vollständige Resynthese des Creatinphosphats und die Senkung der erhöhten Lactat/Pyruvat-Quotienten (siehe Tab.8) in der Erholungsphase beweisen, ist dieser Effekt nicht hypoxiebedingt. Die Sauerstoffaufnahme geht im übrigen während dieser Phase rasch auf Normalwerte zurück, ein Hinweis darauf, daß die aufgenommene Glucose vor allem für den Wiederaufbau des Glykogendepots verwendet wird (Tab.2o). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Glykogenresynthese und erhöhtem Glucosetransport ist nicht ganz



Muskelmetabolite	Ruhe	Arbeit	Erholung
Pyruvat (µmol/g)	(8) 0.107 (± 0.005)	(13) 0.137 (± 0.014)	(13) 0.419 (± 0.030)
Alanin (µmol/g)	(13) 2.207 (± 0.068)	(4) 2.180 (± 0.083)	(9) 1.724 (± 0.088)

Werte untrainierter Ratten

Abb.64: Kontraktionsabhängige Änderungen der Glucoseaufnahme, Lactat- und Pyruvatabgabe und Alaninfreisetzung während insulinfreier Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter untrainierter und trainierter Ratten. Ruhephase: 0 - 2o min, Arbeitsphase: 2o - 4o min, Erholungsphase: 4o - 6o min.
Mittelwerte und s_{EM}.

auszuschließen.
Im Vergleich zu den untrainierten Ratten sind bei Tieren nach einem sechswöchigem Ausdauertraining (siehe Methodikteil) die Glucoseaufnahme und Lactatabgabe während der Arbeits- und Erholungsphase signifikant vermindert. Die deutliche Herabsetzung der Glucoseutilisation kann nicht auf eine unterschiedliche Belastungsintensität während der Arbeitsphase zurückgeführt werden (der Sauerstoffverbrauch untrainierter und trainierter Tiere ist vergleichbar). Die signifikanten Veränderungen sind möglicherweise Ausdruck einer erhöhten oxidativen Kapazität der Muskulatur trainierter Tiere, die sowohl die Fettsäuren- und Ketonkörper- als auch die Pyruvatoxidation betrifft (547); sie ist verbunden mit einer gegenüber untrainierten Ratten bevorzugten Rekrutierung "roter" fast-twitch- und slow-twitch-Fasern unter Muskelarbeit (547, 548). Möglicherweise tragen auch erhöhte stationäre Konzentrationen von Creatinphosphat und Adenosintriphosphat und die verminderte Entstehung von ADP, P_a, AMP und NH_4^+-Ionen zu der geringeren Glykolyserate dieser Tiere bei (547). Trainingsbedingte Änderungen der Muskelfasermembran sind ebenfalls nicht auszuschließen, da jüngste Untersuchungen zeigten, daß die Muskulatur trainierter Ratten eine gesteigerte Insulinsensitivität aufweist (449-451). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß der Glykogengehalt des M. gastrocnemius 24 h-gehungerter trainierter Ratten in vivo signifikant mit 5.34 ($\pm$ 0.35) mg/g FG (n = 6) gegenüber untrainierten Tieren mit 3.43 ($\pm$ 0.11) mg/g FG (n = 10) erhöht ist.
Auf die bis heute offene Diskussion über die Ursache der gesteigerten Glucoseaufnahme unter Muskelarbeit (und in der anschließenden Erholungsphase) soll hier nicht näher eingegangen werden (zur Übersicht 552). Verschiedene eigene Untersuchungsreihen zu diesem Problem ergaben bisher keinen Anhalt für die essentielle Rolle "humoraler Faktoren" (555, 556) oder zunehmender Durchflußraten

	Durchfluß ml/30g × min	Perfusat-pH	O_2-Verbrauch µmol/30g × min	Glykogen mg/g FG
Ruhe (9)	11.1 (± 0.5)	7.37 (± 0.01)	14.03 (± 0.34)	3.47 (± 0.08)
Arbeit (9)	11.4 (± 0.6)	7.20 (± 0.01)	25.42 (± 0.99)	1.19 (± 0.10)
Erholung (9)	10.8 (± 0.7)	7.22 (± 0.02)	15.00 (± 0.33)	1.80 (± 0.14)

Werte untrainierter Ratten

Tab.2o: Durchflußrate, Perfusat-pH, Sauerstoffverbrauch und Glykogengehalt des M. gastrocnemius während Hinterkörperperfusionen mit Arbeitsbelastung. Die Glykogenresyntheserate während der Erholungsphase (Zunahme von 113 µmol Glucoseeinheiten/3o g Muskulatur bei untrainierten Ratten) ist höher als die Glucoseaufnahme (89 µmol/3o g Muskulatur). Möglicherweise wird in dieser Phase Lactat für den Wiederaufbau des Glykogens verwendet (541, 522). Der Lactatgehalt des M. gastrocnemius verringert sich innerhalb dieser Zeit von rund 11 auf 6 µmol/g, ohne daß es zu einem größeren Efflux in das Perfusat kommt.

(557, 558) bei der Auslösung der Aufnahmesteigerung. Die mit der Kontraktion verbundene Änderung der Ca^{++}-Kompartimentierung mit Anstieg der freien Ca^{++}-Konzentration im Sarkoplasma scheint hier von größerer Bedeutung zu sein (559, 56o).

Alaninbildung und -freisetzung während und nach Arbeitsbelastung in vitro

Die erheblichen kontraktionsabhängigen Änderungen des Glucosestoffwechsels, die besonders in der Erholungsphase zu einer stark erhöhten Pyruvatverfügbarkeit innerhalb der Muskelfaser führen, sind nicht verbunden mit einer gesteigerten Alaninbereitstellung. Die Alaninfreisetzung während dieser

Perfusionen ist mit den Werten von Standardperfusionen ohne Arbeitsphase vergleichbar (Abb.64); bei untrainierten Ratten ist der Alaningehalt des M. gastrocnemius, in Übereinstimmung mit dem Trend zu einer verminderten Abgaberate in der Erholungsphase, am Ende der Perfusionen signifikant erniedrigt (für trainierte Tiere liegen entsprechende Werte nicht vor). Während der Arbeitsphase selbst bleibt die Alaninkonzentration konstant; in-vivo-Experimente anderer Autoren erbrachten teils erniedrigte (564), teils gleichbleibende oder leicht ansteigende Werte (565, 566, 562) unter Muskelarbeit.

Die dargestellten Befunde sprechen dafür, daß während und nach Arbeitsbelastung die Aminosäurenverfügbarkeit für den Transaminierungsprozeß nicht erhöht wird; eine Änderung des Netto-Proteinabbaus scheint unter diesen Bedingungen nicht einzutreten (zur Problematik des Proteinumsatzes unter Muskelarbeit: 567-569).

Die Ursache der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von in-vivo-Untersuchungen am Menschen (528-532, 179, 569, 57o), die im übrigen bezüglich der Verhältnisse in der Erholungsphase widersprüchlich sind (529, 57o, 541), und den Perfusionsexperimenten (eigene Versuche und 47, 185, 563) oder in-vivo-Befunden an Ratten (564, 571) ist nicht klar. Möglicherweise führt in vivo das unter Muskelarbeit veränderte hormonelle Milieu (553), beispielsweise der Abfall der Insulinkonzentration (554, 57o, 572) und der Anstieg der Glucocorticoide (57o, 572), zu einer positiven Rückwirkung auf die Alaninfreisetzung. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die kontraktile Aktivität selbst einen insulinähnlich stimulierenden Effekt auf das "alanine-preferring" A-Transportsystem für Aminosäuren hat (567). Im Zusammenhang mit in-vivo-Versuchen (53o) wurde auf die Bedeutung einer gesteigerten Aufnahme verzweigtkettiger Aminosäuren unter Muskelarbeit hingewiesen. In Perfusionen mit erhöhtem Angebot verzeigtkettiger Aminosäuren (je 1 mmol/l Valin, Leucin und Isoleucin) ergab sich eine

allgemeine Steigerung der Alaninfreisetzung; Muskelarbeit hatte jedoch auch unter diesen Bedingungen keinen zusätzlich steigernden Effekt auf die Freisetzungsrate (Tab.21).

	Alaninfreisetzung µmol / 30g × 20 min		Alanin im Muskel µmol / g FG
	Ruhe	Arbeit	nach Arbeit
Perfusionen (9) ohne Aminosäurenzusatz	10.56 (±0.61)	7.57 (±0.31)	(4) 2.180 (± 0.083)
Perfusionen (3) mit je 1 mmol/l Leu, Val, Ile	11.93 (± 1.10)	11.27 (± 0.75)	(3) 3.108 (± 0.056)
Perfusion ohne Arbeitsphase mit je 1 mmol/l Leu, Val, Ile	10.85	10.70	3.016

Tab.21: Alaninfreisetzung unter Muskelarbeit nach Anreicherung des Perfusionsmediums mit verzweigtkettigen Aminosäuren (je 1 mmol/l Leucin, Valin und Isoleucin). Perfusionsbedingungen wie in Abb.64. Mittelwerte und s_{EM}.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den in-vivo- und in-vitro-Untersuchungen, der zu den unterschiedlichen Ergebnissen beitragen könnte, ist die Veränderung der Durchblutungsgröße. Während bei den Perfusionsexperimenten die Flußrate weitgehend konstant bleibt, wird in vivo, je nach Belastungsintensität, ein Anstieg um den Faktor 5 - 2o gemessen (528, 529, 57o). Eine Senkung der stationären extracellulären Alaninkonzentration an der Muskelfasermembran mit entsprechender positiver Rückwirkung auf die Effluxrate ist unter diesen Bedingungen nicht auszuschliessen.

Auch die in vivo möglicherweise ausgeprägtere lokale pH-Verschiebung auf acidotische Werte würde die Alaninfreisetzung aus der arbeitenden Muskulatur begünstigen (s. Abb.63).

5.4 Überdauernde Glucoseaufnahmesteigerung und verminderte Alaninfreisetzung als Charakteristika von Perfusionen nach erschöpfender Muskelarbeit in vivo

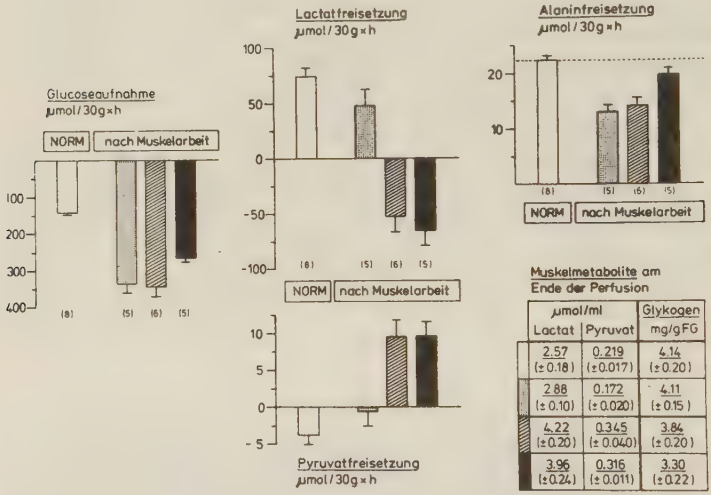
Zur Überprüfung der in der Erholungsphase nach Muskelarbeit zu beobachtenden Veränderungen der Glucoseutilisation und ihrer Beziehung zur Alaninbildung wurden weitere Perfusionsexperimente durchgeführt; sie erfolgten nach erschöpfender Laufbelastung in vivo und zusätzlicher Stimulation der Nn. ischiadici während der Hinterkörperpräparation. Unter diesen Bedingungen werden vor Beginn der Perfusion der Glykogengehalt und die energiereichen Phosphate des M. gastrocnemius stark vermindert, während AMP- und Lactatgehalt einen hohen Anstieg zeigen (Tab.22).

	Glykogen	µmol / g FG				µmol/g FG	
	mg/g FG	CP	ATP	ADP	AMP	Lactat	Pyruvat
Kontrolle [7] ohne Muskelarbeit	3.42 (± 0.11)	18.89 (± 0.51)	7.48 (± 0.22)	0.834 (± 0.023)	0.040 (± 0.004)	1.71 (± 0.10)	0.082 (± 0.007)
nach Arbeitsbelastung in vivo [6]	0.89 (± 0.08)	5.66 (± 0.72)	4.56 (± 0.21)	0.844 (± 0.051)	0.110 (± 0.009)	9.33 (± 1.68)	0.086 (± 0.015)

Tab.22: Glykogengehalt, Creatinphosphat und Adeninnucleotide und Lactat- und Pyruvatgehalt im M. gastrocnemius nach muskulärer Erschöpfung in vivo. Zum Vergleich sind Kontrollwerte am Ende der Präparation des Hinterkörpers 24 h-gehungerter Ratten angegeben.
Auf die rasche Resynthese der energiereichen Phosphate (Normalisierung nach etwa 2o min Perfusion) wurde bereits hingewiesen (siehe Tab.8).
Mittelwerte und s_{EM}.

Während der gesamten einstündigen Perfusionsdauer ist die bereits für die Erholungsphase beschriebene "insulinähnliche"

Stimulation der Glucoseaufnahme zu beobachten (Abb.65); sie geht einher mit einer vollständigen Wiederauffüllung des Glykogendepots und der weitgehenden Normalisierung der zuvor erhöhten Lactatkonzentration im Muskel.



Muskelmetabolite am Ende der Perfusion

µmol/ml		Glykogen
Lactat	Pyruvat	mg/gFG
2.57 (± 0.18)	0.219 (± 0.017)	4.14 (± 0.20)
2.88 (± 0.10)	0.172 (± 0.020)	4.11 (± 0.15)
4.22 (± 0.20)	0.345 (± 0.040)	3.84 (± 0.20)
3.96 (± 0.24)	0.316 (± 0.011)	3.30 (± 0.22)

☐ Kontrollperfusionen ohne vorhergehende Muskelarbeit;

Perfusionen im Anschluß an Muskelarbeit in vivo:

▦ untrainierte Ratten: 1 mmol/l Lactat im Perfusat;
▨ untrainierte Ratten: 7 mmol/l Lactat im Perfusat;
■ trainierte Ratten: 7 mmol/l Lactat im Perfusat.

Abb.65: Glucoseaufnahme, Lactat- und Pyruvatutilisation und Alaninfreisetzung in Perfusionen nach erschöpfender Muskelarbeit in vivo.
Untersuchungen an 24 h-gehungerten untrainierten und trainierten Ratten mit unterschiedlichen Lactatkonzentrationen (1 mmol/l, 7 mmol/l) zu Beginn der Perfusion. Zum Vergleich sind die Werte von Standardperfusionen ohne vorhergehende Muskelarbeit dargestellt. Mittelwerte und s_{EM}.

Analog zu Perfusionen mit in vitro durchgeführter Arbeitsbelastung kommt es auch in diesen Versuchen zu einer ge-

ringeren Glucoseaufnahme bei Ratten im Trainingszustand. Artifizielle Erhöhung der Lactatkonzentration im Perfusat auf 7 mmol/l (einer Konzentration, die durchaus den realen Verhältnissen nach Laufbelastung von Ratten entspricht: 566, 614) führt auch in Perfusionen nach akutem Erschöpfungszustand zu einer signifikanten Aufnahme des Substrates durch die Muskulatur mit konsekutiver Pyruvatfreisetzung und Erhöhung der intracellulären Pyruvatkonzentration.
Mit Ausnahme der trainierten Ratten ist unter diesen Bedingungen, wiederum im Gegensatz zu Befunden am Menschen (529), die Alaninfreisetzung signifikant vermindert. Die Erklärung dieses Befundes, der sich bei untrainierten Ratten auch schon in der kurzen Erholungsphase nach in-vitro-Belastung andeutete (siehe Abb.64), ist wahrscheinlich die Resynthese von Adenosinmonophosphat (AMP) aus Inosinsäure (IMP) im sogenannten "Purinnucleotid-Zyklus" (563, 615). Die während der Muskelarbeit in der Adenylatdesaminase-Reaktion gebildete Inosinsäure (561-563) kann in dieser Phase mit Hilfe von Aspartat und über das Zwischenprodukt Adenylosuccinat reaminiert werden (562). Im Rahmen der "Nachlieferung" von Aspartat wird dabei Glutamat der Alaninaminotransferase-Reaktion entzogen (Abb.66).

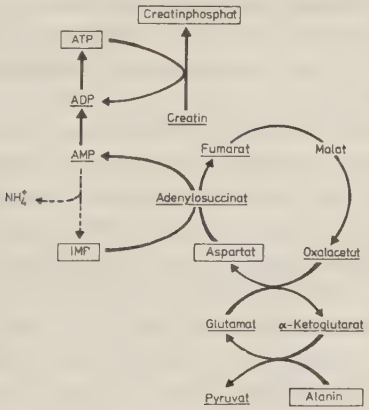


Abb.66: Möglicher Mechanismus der verminderten Alaninsynthese und -freisetzung in der Erholungsphase nach Muskelarbeit.

Die höhere Alaninfreisetzung durch die Muskulatur trainierter Ratten würde in diesem Sinne Folge einer verminderten AMP- und IMP-Bildung unter Muskelarbeit sein. Anhaltspunkte dafür sind gegeben (547).

5.5 Regulation der Alaninfreisetzung aus der Muskulatur hungernder intakter Ratten durch Erhöhung der Aminosäurenverfügbarkeit

Als Vergleich zu den beschriebenen Experimenten mit einseitiger Variation der intracellulären Pyruvatverfügbarkeit wurde der Einfluß eines erhöhten Angebots glutamatbildender Aminosäuren (Aspartat, Leucin, Valin, Isoleucin) auf die Alaninsynthese und -freisetzung der perfundierten Muskulatur untersucht. Auf den Stoffwechsel dieser Aminosäuren, die in einer Konzentration von 5 mmol/l dem Perfusionsmedium zugesetzt wurden, ist bereits im Rahmen der Besprechung analoger Untersuchungen an adrenalektomierten Tieren eingegangen worden.

Wie von anderen Autoren gezeigt wurde (5o), erfolgt die Aufnahme der Aminosäuren in die Muskelfaser konzentrationsabhängig mit unterschiedlicher Rate (Leucin > Valin, Isoleucin > Aspartat). Unter den dargestellten Versuchsbedingungen beträgt die Aufnahmerate für Leucin 27.5 ($\pm$ 0.7) nmol x min^{-1} x g^{-1} (n = 6), für Valin 12.3 ($\pm$ 2.5) nmol x min^{-1} x g^{-1} (n = 6) und für Aspartat 8.5 ($\pm$ 0.7) nmol x min^{-1} x g^{-1} (n = 6).

Die Einschleusung des Aminosäurenkohlenstoffs in den Intermediärstoffwechsel des Muskels wird an der $^{14}CO_2$- und ^{14}C-Alaninbildung aus Tracerzusätzen deutlich (Abb.67).

Die quantitativen Unterschiede in der $^{14}CO_2$-Bildung und der signifikant erhöhte Sauerstoffverbrauch nach Leucinzusatz sprechen für den bevorzugten Abbau dieser Aminosäure durch die Muskulatur (5o5) (dabei ist die gegenüber den beiden anderen Aminosäuren gesteigerte Aufnahmerate zu berücksichtigen). Eine hohe Einschleusung von ^{14}C-Acetyl-CoA in den Citratzyklus mit radioaktiver Markierung

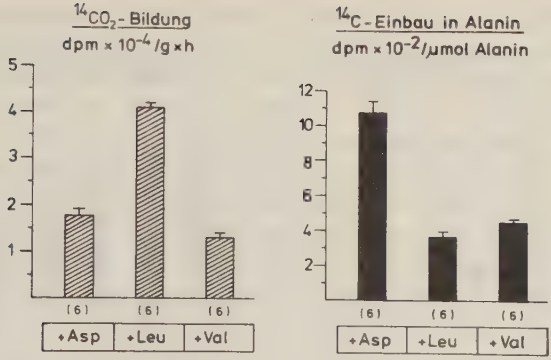


Abb.67: $^{14}CO_2$-Bildung und ^{14}C-Einbau in freigesetztes Alanin aus (U-^{14}C)Aminosäuren (2o µCi/dl) während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter intakter Ratten (NORM). Mittelwerte und s_{EM}.
In Übereinstimmung mit der hohen Oxidationsrate ist in Perfusionen mit Leucinzusatz der Sauerstoffverbrauch des Präparates signifikant um 2o - 3o % erhöht.

der Zyklusintermediate ist vermutlich auch die Ursache für die überraschend hohe ^{14}C-Markierung des freigesetzten Alanins in Versuchen mit Leucinzusatz (Pyruvatentstehung aus Oxalacetat oder Malat; da während des Zyklusdurchlaufs 2 mol CO_2/mol Acetyl-CoA entfernt werden, kann Leucin selbst zu keiner Netto-Bildung von Pyruvat führen).
Die von anderen Autoren (8o) postulierte Netto-Pyruvatbildung aus Leucin (auf einem bisher unbekannten Stoffwechselweg des Muskels) ist aufgrund der im folgenden darzustellenden Ergebnisse weitgehend auszuschließen.
Aspartat und Valin münden als C_4-Körper (Oxalacetat und Succinyl-CoA) in den Citratzyklus ein. Der besonders für Aspartat ausgeprägte ^{14}C-Einbau in Alanin beweist, daß diese Aminosäuren zu einer Pyruvatbildung im Muskel beitragen. Gleiches gilt wahrscheinlich auch für Isoleucin, dessen Abbau Acetyl-CoA und Succinyl-CoA liefert (518).
Auf die zugrundeliegenden Stoffwechselwege wurde bereits

an anderer Stelle der Arbeit (siehe Abb.51) eingegangen. In Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen an adrenalektomierten Ratten,haben die einzelnen Aminosäuren unterschiedliche Effekte auf die Alaninbildung und -freisetzung durch die Muskulatur (Abb.68). Während Aspartatzusatz keinen und Leucinzusatz nur einen geringen signifikanten Effekt auf die Alaninfreisetzung durch den isolierten Hinterkörper hungernder Ratten hat, führt die erhöhte Verfügbarkeit der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin zu einer hochsignifikanten Steigerung der Freisetzungrate. Der auffallende Wirkungsunterschied in der Gruppe der verzweigtkettigen Aminosäuren beruht auf einer mit den Aminosäurenzusätzen verbundenen Änderung der Pyruvatverfügbarkeit. Im Gegensatz zu Perfusionen mit Leucin, die von einer signifikanten Abnahme des Muskelpyruvatgehaltes und Zunahme der Pyruvatextraktion aus dem Medium begleitet sind, verläuft die alaninsteigernde Wirkung von Valin- und Isoleucinzusätzen unter weitgehender Konstanz des Pyruvatgehaltes des Systems (Abb.69). Wie oben erwähnt, führt der Abbau dieser Aminosäuren nicht nur zur Glutamat-, sondern auch zur Pyruvatbereitstellung.

Die limitierende Funktion des Pyruvats für die leucinstimulierte Alaninsynthese wird deutlich in der hohen Glutamatakkumulation des Muskels unter Perfusionsbedingungen mit physiologischer Pyruvatkonzentration (Abb.69). Wird der Pyruvatgehalt des Mediums erhöht, tritt eine signifikante und mit den Werten bei Valin- und Isoleucinperfusionen vergleichbare Steigerung der Alaninfreisetzung ein.

Ein weiterer interessanter Befund dieser Untersuchungsreihe, der sich bei Experimenten mit adrenalektomierten Ratten bestätigte (in der Arbeit nicht dargestellt), ist die fehlende Alanin- und Glutaminmehrsynthese in Perfusionen unter Aspartatzusatz (5 mmol/l). Die erheblich gesteigerte Glutamatbildung manifestiert sich ausschließlich in einer hochsignifikanten Zunahme des Glutamateffluxes (Abb.69), dessen Größe etwa der Aspartataufnahme während der Perfusion

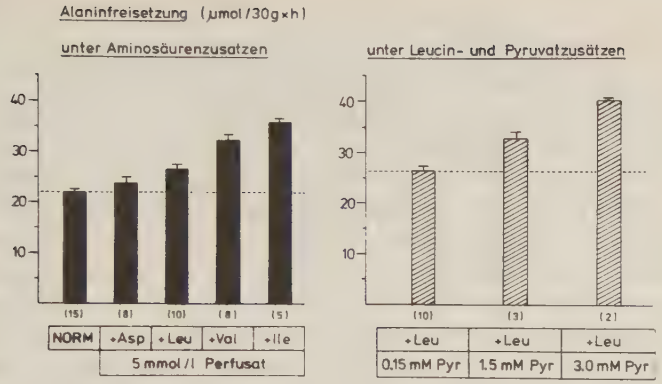


Abb.68: Alaninfreisetzung durch den perfundierten Hinterkörper 24 h-gehungerter intakter Ratten (NORM) in Perfusionen mit erhöhter Aminosäurenverfügbarkeit (5 mmol/l Aspartat, Leucin, Valin oder Isoleucin als Einzelzusätze zum Standard-Perfusionsmedium). Mittelwerte und s_{EM}.
Während Aspartat (+ Asp) und Leucin (+ Leu) einen nur geringen Effekt auf die Alaninfreisetzung haben, führt die erhöhte Verfügbarkeit der Aminosäuren Valin (+ Val) und Isoleucin (+ Ile) zu einer starken Steigerung der Freisetzungsrate (links). Eine gleiche Wirkung haben Pyruvatzusätze bei Perfusionen mit Leucin (rechts).

(15.3 ($\pm$ 1.3) µmol x h^{-1} x 3o g^{-1}) entspricht. Die Ursache für das Ausbleiben einer "intracellulären Reaktion" auf die erhöhte Glutamatverfügbarkeit ist unbekannt. Ob dabei ein Aspartat-Glutamat-Austausch, wie er für Mitochondrien beschrieben wurde (62o), oder die Kompartimentierung von Enzymen eine Rolle spielt, muß offenbleiben. Eine ebenfalls schwer zu interpretierende Steigerung des Glutamateffluxes war, wie bereits beschrieben, unter hohen Lactat- und Pyruvatzusätzen bei Hinterkörperperfusionen adrenalektomierter Ratten zu messen; sie konnte durch Insulinzusatz (1 mU/ml) zum Perfusat aufgehoben werden.
Untersuchungen anderer Autoren an inkubierten Muskelprä-

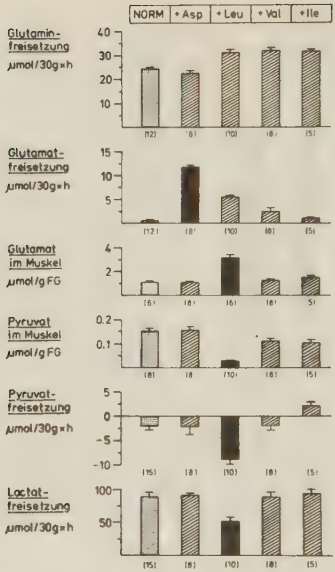


Abb.69: Wirkung von Aminosäurenzusätzen zum Perfusionsmedium auf die Glutaminfreisetzung, Glutamatbildung, Pyruvatverfügbarkeit und Lactatfreisetzung (Bedingungen wie in Abb.68). Mittelwerte und s_{EM}. Zu beachten ist die starke Steigerung des Glutamateffluxes bei Perfusionen mit Aspartatzusätzen und die Glutamatakkumulation im Muskel unter gleichzeitiger Reduzierung des Pyruvatgehaltes bei Perfusionen mit Leucinzusätzen. Valin und Isoleucin haben dagegen, trotz erheblicher Zunahme der Alaninfreisetzung, "pyruvaterhaltende" Wirkung.

paraten ergaben bezüglich der Steigerung der Glutamin- und Alaninfreisetzung durch Aspartat widersprüchliche Befunde (8o, 492); übereinstimmend wurde jedoch ein signifikanter Anstieg der Glutamatfreisetzung angegeben, der in einem Fall (8o) ähnlich auffallend war wie in den eigenen Versuchen.

Zusammenfassung

Einseitige Änderungen der Pyruvatverfügbarkeit im Sinne des "Glucose-Alanin-Zyklus" sind von untergeordneter Bedeutung für die Regulation der Alaninfreisetzung aus der perfundierten Muskulatur normaler hungernder Ratten. Dieses Ergebnis gilt nicht nur für die ruhende Muskulatur, sondern auch für die Stoffwechsellage unter Muskelarbeit und in der sich anschließenden Erholungsphase.
Modellversuche mit Aminosäurenzusätzen zum Perfusionsmedium weisen darauf hin, daß die Änderung der intracellulären Verfügbarkeit bestimmter Aminosäuren für die Alaninsynthese und -freisetzung in Gluconeogenesesituationen von entscheidender Bedeutung ist. Den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin scheint dabei eine Schlüsselfunktion zuzukommen, die sich aus dem Intermediärstoffwechsel dieser Aminosäuren ableiten läßt. Durch die gleichzeitige Bereitstellung von Glutamat und Pyruvat können sie "per se" zu einer de-novo-Alaninsynthese führen. Der alaninsteigernde Effekt des bevorzugt oxidativ abgebauten Leucins ist dagegen auf eine Pyruvatbereitstellung aus anderen Quellen angewiesen.
Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe sprechen dafür, daß die physiologische Modulation der Alaninfreisetzung durch die Muskulatur ursächlich mit Veränderungen des Proteinumsatzes verbunden ist. Erst bei Zunahme der Aminosäurenverfügbarkeit wird, wie die Versuche mit Leucinzusatz zeigen, durch die gleichzeitige Steigerung der Pyruvatverfügbarkeit die Effektivität des Syntheseprozesses beträchtlich erhöht.

B. Untersuchungen an adrenalektomiert-diabetischen Ratten

1. Die pathophysiologische Bedeutung der Glucocorticoidwirkung auf die Alaninfreisetzung und Glucoseutilisation des Muskels für die Hyperglykämie im Insulinmangel

Charakteristisches Merkmal der adrenalektomiert-diabetischen Ratte ist die Entwicklung einer Hypoglykämie im Hungerzustand (Abb.7o). Dieser auffallende Befund, der bereits 1947 von M.E. KRAHL und C.F. CORI beschrieben wurde ("diabetic-adrenalectomized rats could not be safely fasted for 16 to 2o hours, as they tended to die of hypoglycemia": 413), hat bisher erstaunlicherweise experimentell wenig Berücksichtigung gefunden. Während vereinzelte Untersuchungen der Glucoseaufnahme durch isolierte Diaphragmen (413, 414) oder Rattenherzen (417, 419) widersprüchliche Resultate ergaben, beschrieb O.K. SMITH 1968 eine stark beschleunigte Abnahme der Blutglucosekonzentration bei eviscerierten adrenalektomiert-diabetischen Ratten (271). Der Blutglucoseabfall führte bei vielen dieser Tiere innerhalb von 6 Stunden unter hypoglykämischen Konvulsionen zum Exitus; er ließ sich durch Cortisolvorbehandlung der Ratten verhindern.

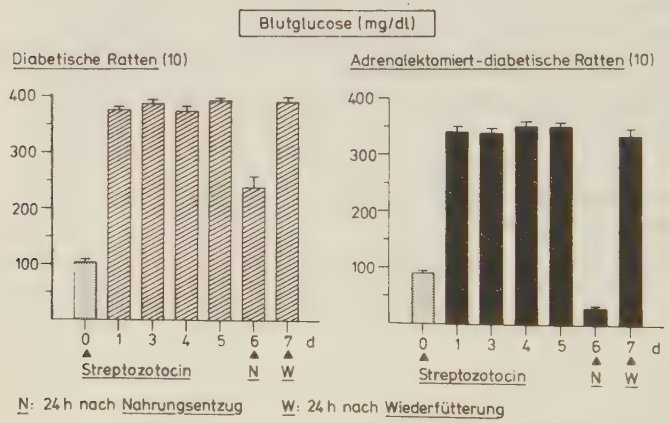


Abb.7o: Blutglucosekonzentrationen diabetischer (DIAB) und adrenalektomiert-diabetischer Ratten (ADX-DIAB) während Nahrungszufuhr und nach 24 h Nahrungsentzug. Mittelwerte und s_{EM}.

Die Befunde am eviscerierten Tier entsprechen der in vivo-Situation bei den vorliegenden Untersuchungsreihen. Nach Substitution mit einer geringen Betamethasondosis (15o µg/1oo g KG) zu Beginn und gegen Ende des 24-stündigen Hungerzustands ist die für diabetische Tiere typische Hyperglykämie auch bei adrenalektomiert-diabetischen Ratten zu messen (Abb.71).

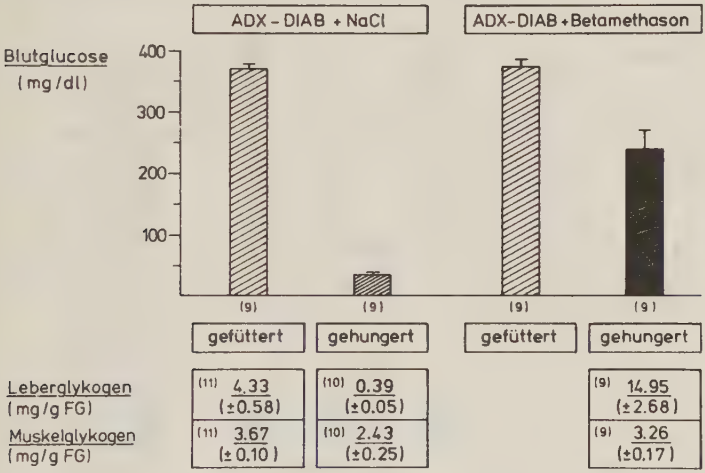


Abb.71: Auslösung der diabetischen Hyperglykämie bei hungernden adrenalektomiert-diabetischen Ratten (ADX-DIAB) durch zweimalige Betamethasoninjektion (15o µg/1oo g KG) zu Beginn und nach 2o h-Nahrungsentzug. Mittelwerte und s_{EM}.

Als eine wesentliche Ursache der gegenüber diabetischen Ratten abweichenden Reaktion adrenalektomiert-diabetischer Tiere auf Nahrungsentzug sind Veränderungen des Muskelstoffwechsels anzusehen. Sie manifestieren sich auf der Ebene der Glucoseutilisation und der Aminosäurenbereitstellung und sind bereits durch einmalige Glucocorticoidapplikation weitgehend reversibel (Abb.72). Die Glucoseaufnahme des isoliert perfundierten Hinterkörpers adrenalektomiert-

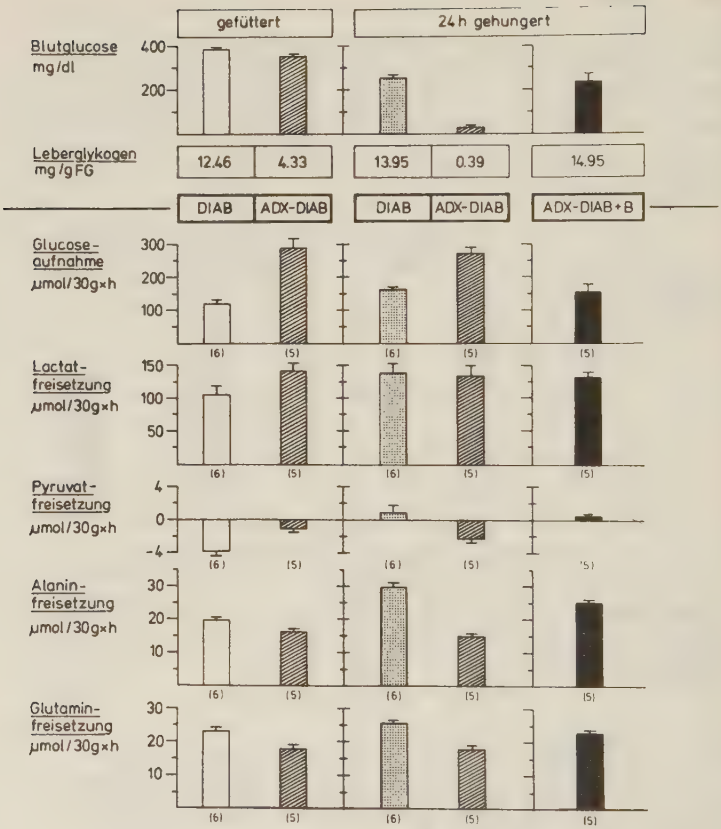


Abb. 72: Merkmale der Stoffwechselanpassung der Muskulatur diabetischer (DIAB) und adrenalektomiert-diabetischer Ratten (ADX-DIAB) an einen 24 h-Nahrungsentzug und die Wirkung einer einmaligen Betamethasoninjektion (ADX-DIAB + B: 500 µg/100 g KG, 3 - 4 h vor der Perfusion) bei den hungernden adrenalektomiert-diabetischen Ratten.
Zum Vergleich der in vitro-Stoffwechselveränderungen der Muskulatur mit der in vivo-Situation sind die Blutglucosekonzentrationen und die Leberglykogenwerte der Ratten dargestellt. Mittelwerte und s_{EM}.

Abb.72 (Fortsetzung): Metabolite des M.gastrocnemius am Ende von Hinterkörperperfusionen gefütterter und 24 h-gehungerter diabetischer (DIAB) und adrenalektomiert-diabetischer (ADX-DIAB) Ratten ohne und mit (+B) Betamethasoninjektion. Mittelwerte und s_{EM}.

Muskelmetabolite	gefüttert		24 h gehungert		
	DIAB	ADX-DIAB	DIAB	ADX-DIAB	ADX-DIAB+B
Glucose µmol/ml$_{ic}$	(6) 2.90 (±0.43)	(5) 2.47 (± 0.51)	(6) 2.15 (± 0.50)	(5) 1.16 (± 0.21)	(5) 0.40 (± 0.30)
G-6-P µmol/g FG	0.286 (± 0.017)	0.235 (±0.012)	0.271 (±0.018)	0.273 (± 0.017)	0.274 (±0.019)
Citrat µmol/g FG	0.147 (±0.006)	0.175 (± 0.014)	0.178 (±0.039)	0.186 (±0.009)	0.142 (± 0.008)
Lactat µmol/g FG	2.35 (± 0.15)	2.96 (± 0.38)	2.13 (±0.11)	3.10 (±0.53)	2.97 (±0.57)
Pyruvat µmol/g FG	0.103 (± 0.009)	0.123 (±0.009)	0.116 (± 0.012)	0.094 (±0.008)	0.090 (± 0.019)
Glykogen mg/g FG	4.23 (±0.13)	3.96 (±0.34)	3.83 (± 0.35)	3.48 (± 0.14)	3.17 (± 0.24)
Alanin µmol/ml$_{ic}$	4.73 (± 0.35)	4.03 (± 0.14)	3.64 (± 0.25)	3.10 (± 0.10)	3.76 (± 0.18)
Gradient ic/ec	14.1	13.2	7.7	10.4	8.3

diabetischer Ratten ist sowohl im Futter- als auch im Hungerzustand gegenüber diabetischen Tieren signifikant gesteigert; Lactatfreisetzung und Pyruvatutilisation zeigen demgegenüber nur geringe Unterschiede. Alanin- und Glutaminfreisetzung sind, unabhängig von der Nahrungszufuhr, signifikant erniedrigt; besonders auffallend ist die quantitative Diskrepanz der Alaninfreisetzung im Hungerzustand.
Ein zentraler Defekt des Muskelstoffwechsels der adrenalektomiert-diabetischen Ratten betrifft den Adaptationsmechanismus an den Hungerzustand: während diabetische Tiere nach Entzug der Nahrung mit einer weiteren Zunahme der Freisetzung der Gluconeogenesesubstrate Lactat, Pyruvat und Alanin reagieren, versagt dieser Mechanismus bei den glucocorticoiddefizienten Ratten. Besonders prägnant und wahrscheinlich von primärer Bedeutung für die Störung der Glucosehomöostase ist das Ausbleiben des Alaninanstiegs. Gegenüber diabetischen Ratten mit intakter Glucocorticoidsekretion wird die Bereitstellung der Aminosäure um rund 1oo % reduziert. Die anhaltend hohe Glucoseutilisation durch die Muskulatur der hungernden Tiere kann weder durch eine effiziente Leberglykogenolyse (siehe Abb.72 oben), noch durch eine adäquate Zunahme von Gluconeogenesepräcursoren, vor allem Alanin, ausgeglichen werden. Gleichzeitig ist, wie Untersuchungen der Arbeitsgruppe von J.H. EXTON ergaben (212), die Gluconeogenesekapazität der Leber dieser Ratten herabgesetzt. Es resultiert die beschriebene Hypoglykämie, die innerhalb kurzer Zeit zum Tod der Tiere führt. Die Ergebnisse lassen zugleich sehr deutlich die essentielle Funktion der Glucocorticoide (und ihres ausgewogenen Verhältnisses zu Insulin) bei der normalen Anpassung an den Hungerzustand erkennen.
Die exogene Zufuhr von Glucose und Gluconeogenesesubstraten mit der Nahrung hebt, wie an der Hyperglykämie im Futterzustand (besonders deutlich nach Wiederfütterung: siehe Abb.7o) sichtbar wird, den Defekt der adrenalektomiert-diabetischen Ratten praktisch vollständig auf.

Eine vergleichbare Wirkung hat Glucocorticoidsubstitution. Wenige Stunden nach Betamethasoninjektion wird die Glucose- und Aminosäurenverfügbarkeit der hungernden Tiere "endogen" gesteigert. Die Glucoseutilisation der perfundierten Muskulatur wird signifikant reduziert (Abb.72); wie die Konzentrationsabnahme freier Glucose und der unveränderte Glucose-6-phosphatgehalt des Muskels zeigen, handelt es sich dabei wahrscheinlich um eine Einschränkung des Membrantransportes. Hinweise auf einen ähnlichen Hormoneffekt ergaben sich bisher am Fettgewebe (48o, 621, 622, 265), an Zellen des lymphatischen Systems (485, 486, 623, 624) und an Epidermispräparaten (625, 626). Der zugrundeliegende Mechanismus ist ungeklärt; die Induktion transportinhibierender Proteine und die Modulation von Auf- oder Abbauraten labiler Proteinkomponenten des Transportsystems werden diskutiert (268, 266, 624, 621, 627, 265).
Parallel zur Verminderung des Glucoseverbrauches wird kurzfristig die Aminosäurenbereitstellung gesteigert (Abb.72, Abb.45). Besonderes quantitatives Gewicht erhält dabei, analog zu den Befunden an diabetischen Tieren, die Freisetzung von Alanin, das neben Lactat den Hauptanteil an der in dieser Situation erhöhten Glucosebildung durch die Leber (212) ausmachen dürfte. Die Kombination der Glucoseutilisationshemmung mit dem durch anti-anabole Effekte ausgelösten vermehrten Präcursorfluß von der Muskulatur zur Leber führt zu einem "Glucoseüberschuß", der sich in der Hyperglykämie und hepatischen Glykogendeposition manifestiert.
Die Ausfallserscheinungen an adrenalektomiert-diabetischen Ratten und ihre Reversibilität unter Glucocorticoidsubstitution sprechen dafür, daß nicht nur der Insulinmangel, sondern ganz entscheidend das Übergewicht der Glucocorticoide für die Stoffwechselsymptomatik des Diabetes mellitus verantwortlich ist.

2. Das Insulin/Glucocorticoid-Verhältnis als Determinante der Alaninfreisetzung aus der Skelettmuskulatur

Verschiedene der bisher dargestellten Versuchsergebnisse unterstützen die in der Einleitung angesprochene Hypothese, daß die Rate der muskulären Alaninfreisetzung in vivo durch das aktuelle Insulin/Glucocorticoid-Verhältnis bestimmt wird. So findet sich der niedrigste in Hinterkörperperfusionen gemessene Wert bei der gefütterten adrenalektomierten Ratte (mit hohem Übergewicht des Insulins), der höchste dagegen bei der gehungerten diabetischen Ratte (mit hohem Übergewicht der Glucocorticoide). Zwischen beiden Werten liegt eine Differenz von 2o µmol/3o g Muskulatur x h, annähernd die Freisetzungsrate, die bei der hungernden normalen Ratte zu messen ist.

In welchem Umfang die Alaninfreisetzung aus der Muskulatur an das ausgewogene Verhältnis beider Hormone gebunden ist, zeigt die Zusammenstellung der zuvor getrennt besprochenen Daten (Abb. 73).

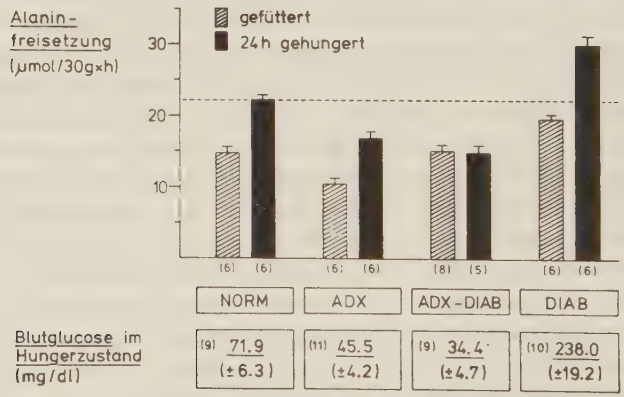


Abb. 73: Beziehungen zwischen Insulin/Glucocorticoid-Verhältnis, Alaninfreisetzung und Glucosehomöostase im Hungerzustand. Hinterkörperperfusionen gefütterter und 24 h-gehungerter intakter (NORM), adrenalektomierter (ADX), adrenalektomiert-diabetischer (ADX-DIAB) und diabetischer (DIAB) Ratten. Zum Vergleich sind die in vivo-Blutglucosewerte (Schwanzvene) nach 24 h-Nahrungsentzug dargestellt. Mittelwerte und s_{EM}.

Die unter Nahrungszufuhr niedrige Rate der Alaninfreisetzung durch die Muskulatur normaler Ratten wird unter Rückgang der Insulinkonzentration im Hungerzustand signifikant gesteigert. Auf die Mechanismen, die den Anstieg auslösen, wurde bereits ausführlich eingegangen. Neben der Abnahme der Insulinwirkung auf den Aminosäurentransport, Proteinumsatz und oxidativen Pyruvatfluß, scheint dem Abfall der extracellulären Alaninkonzentration in vivo eine Auslöserfunktion für die Zunahme der Effluxrate zuzukommen; da seine Größe durch die hepatische Extraktion und Gluconeogenese-rate bestimmt wird, unterliegt auch dieser Vorgang indirekt der hormonellen Regulation.
Die absolute Rate der Alaninfreisetzung ergibt sich aus der quantitativen Relation der Insulin- zur Glucocorticoidwirkung. Während sie im Glucocorticoidmangel (ADX) sowohl im Futter- als auch im Hungerzustand gleichermaßen herabgesetzt ist, resultiert im Insulinmangeldiabetes (DIAB) in beiden Situationen eine signifikante Steigerung der Alaninabgabe. Der Ausfall beider Hormone bei adrenalektomiert-diabetischen Ratten (ADX-DIAB) hat ein Versagen des Anpassungsmechanismus zur Folge: aufgrund des Insulinmangels zeigen diese Ratten bereits im Futterzustand die Freisetzungsrate der adrenalektomierten Kontrolltiere, und aufgrund des Glucocorticoidmangels bleibt, im Gegensatz zu den diabetischen Tieren, ein weiterer Anstieg nach Nahrungsentzug aus.

Die enge Korrelation zwischen Alaninfreisetzungsraten und Höhe der Blutglucosekonzentrationen im Hungerzustand weist auf die wichtige Funktion des Substrates im Rahmen der Gluconeogenese und Glucosehomöostase hin. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß sich die Gluconeogenesekapazität der isolierten Leber weitgehend parallel zu den Veränderungen der Alaninabgabe aus der Muskulatur verhält (212, 213, 380) (Tab.23).

(^{14}C) Glucosesynthese ($cpm \times 10^{-3}$ / 100 g KG × h)

NORM	ADX	ADX-DIAB	DIAB
174 (± 8)	81 (± 4)	136 (± 7)	192 (± 10)

Tab.23: Gluconeogenesekapazität der isolierten Leber normaler (NORM), adrenalektomierter (ADX), adrenalektomiert-diabetischer (ADX-DIAB) und diabetischer Ratten (DIAB): Untersuchung der (^{14}C)Glucosebildung aus (U-^{14}C) Lactat (Substratkonzentration 2o mmol/l) bei gehungerten (NORM, ADX) oder gefütterten (ADX-DIAB, DIAB) Ratten. Mittelwerte und s_E (n = 15 - 28). Zusammengestellt nach Daten der Arbeitsgruppe von J.H. EXTON (212, 213).

Die reduzierten Raten der Gluconeogenese bei adrenalektomierten und adrenalektomiert-diabetischen Ratten sind durch Glucocorticoidsubstitution zu korrigieren. Vergleichbare Befunde ergaben frühere Untersuchungen unseres Institutes (72, 7o). Diese Versuche zeigten, daß sich, analog zur Alaninfreisetzung aus der Muskulatur, auch die Alanin-gluconeogenese der isolierten Leber durch Insulin reduzieren läßt (7o, 72).
Sowohl die extrahepatische Substratfreisetzung als auch die hepatische Utilisation sind aufgrund dieser Befunde an das Vorhandensein physiologischer Glucocorticoidkonzentrationen im Blut gebunden; die nahrungsabhängig unterschiedliche quantitative Ausprägung der Hormoneffekte kann auf die Zu- oder Abnahme der Insulinwirkung zurückgeführt werden.

Nachweis der Interaktion von Glucocorticoiden und Insulin bei der Alaninfreisetzung aus der Skelettmuskulatur

Der direkte Nachweis für das Zusammenwirken von Glucocorticoiden und Insulin bei der Regulation der Alaninfreisetzung aus der Skelettmuskulatur ergibt sich aus Substitutions-

experimenten mit adrenalektomiert-diabetischen Ratten (Abb.74).
Die basal niedrige Freisetzungsrate, die durch akute Insulinapplikation nur geringfügig beeinflußt werden kann, wird nach einmaliger Betamethasoninjektion sowohl im Futter- als auch im Hungerzustand erheblich gesteigert. Insulinzusatz (0.5 mU/ml) zum Perfusionsmedium hat unter diesen Bedingungen einen signifikant senkenden Effekt; der aus der antagonistischen Wirkung beider Hormone resultierende Wert entspricht dem Normalbefund bei der hungernden Ratte.

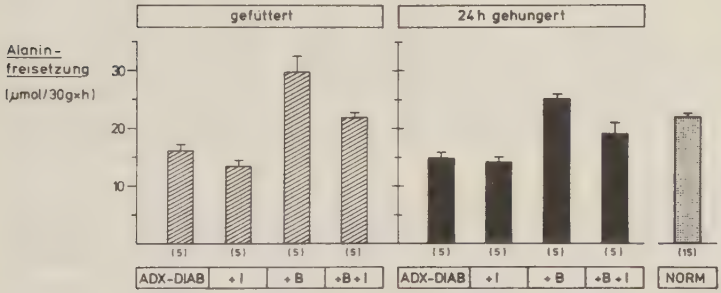


Abb.74: Regulation der Alaninfreisetzung aus der Muskulatur adrenalektomiert-diabetischer Ratten (ADX-DIAB) durch Glucocorticoide und Insulin. Die einmalige Betamethasoninjektion (+ B: 5oo µg/1oo g KG i.p.) erfolgte 3 - 4 h vor der Perfusion; Insulin (+ I: 0.5 mU/ml) wurde dem Medium zu Beginn der Perfusion zugesetzt.
Mittelwerte und s_{EM}.

Das Ergebnis der Akutexperimente wird bestätigt in Hinterkörperperfusionen nach mehrtägiger Substitution mit Betamethason (15o µg/1oo KG x d über 3 Tage) oder Insulin (3 - 4 U/1oo g KG x d über 4.5 Tage) (Abb.75). Während Insulinsubstitution in diesen Versuchen die Freisetzungsrate auf sehr niedrige Werte reduziert, hat Betamethason

den bekannten steigernden Effekt. Kombinierte Substitution beider Hormone führt wiederum zu einer mittleren Freisetzungsrate, deren Größenordnung im physiologischen Bereich liegt.

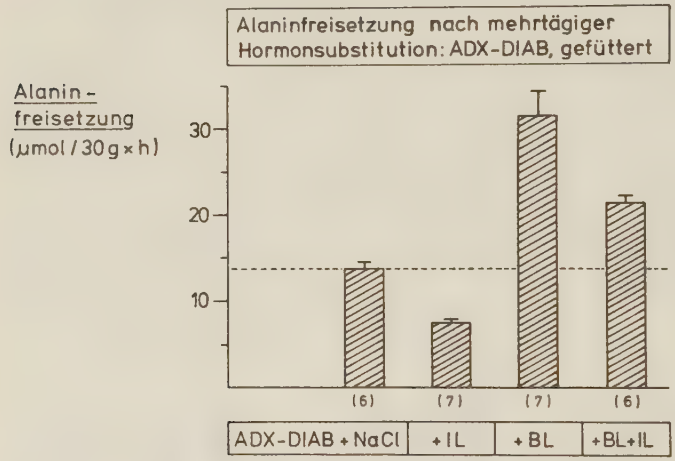


Abb.75: Alaninfreisetzung aus der Muskulatur adrenalektomiert-diabetischer Ratten (ADX-DIAB) nach mehrtägiger Substitution mit Insulin (+ IL: 3 - 4 U/1oo g KG x d über 4.5 Tage), Betamethason (+ BL: 15o µg/1oo g KG x d über 3 Tage) oder beiden Hormonen (+ BL + IL).
Das Perfusionsmedium enthielt keinen Insulinzusatz.
Mittelwerte und s_{EM}.

Der Befund der "mittleren Freisetzungsrate" unter kombinierter Hormonsubstitution spricht dafür, daß beide Hormone aufgrund unterschiedlicher subcellulärer Angriffspunkte unabhängig nebeneinander wirksam sind; der resultierende Meßwert ergibt sich aus der "gegenläufigen Richtung" der Hormoneffekte.

Ein Hinweis auf die Art der subcellulären Wirkungen läßt sich aus der Analyse der Glutaminfreisetzung in den dargestellten Versuchen ableiten (Tab.24). Die Freisetzung dieser Aminosäure scheint weniger von direkten Änderungen der Transportrate (der Transport erfolgt wahrscheinlich nicht über das hormon- und substratregulierte A-System: siehe 441)

als vielmehr von Änderungen des Proteinumsatzes bestimmt zu werden.

Glutaminfreisetzung (µmol/30 g × h)

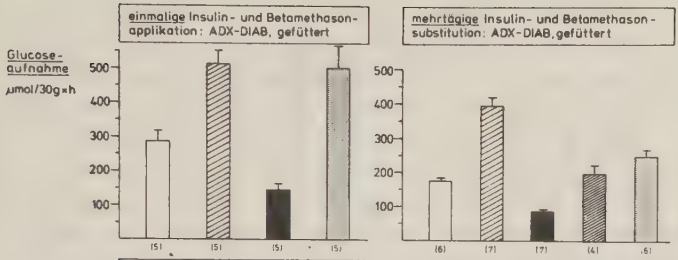
	ADX-DIAB	+ Insulin	+ Betamethason	+ Insulin + Betamethason
einmalige Hormonapplikation (5)	17.92 (± 1.04)	17.00 (± 0.91)	24.72 (± 1.97)	23.30 (± 1.02)
mehrtägige Hormonsubstitution (6-7)	15.20 (± 0.49)	12.98 (± 0.66)	36.45 (± 1.71)	20.72 (± 0.82)

Tab.24: Insulin- und Glucocorticoideffekte auf die Glutaminfreisetzung während Hinterkörperperfusionen gefütterter adrenalektomiert-diabetischer Ratten (ADX-DIAB). Bedingungen wie in Abb.74 (akute Applikation) und Abb.75 (mehrtägige Substitution). Mittelwerte und s_{EM}.

Betamethason stimuliert die Glutaminfreisetzung sowohl nach einmaliger als auch, besonders intensiv, nach mehrtägiger Substitution. Akuter Insulinzusatz zum Perfusat hat keinen Einfluß auf die Glutaminfreisetzung; nach mehrtägiger Gabe des Hormons wird jedoch die basale und, sehr ausgeprägt, die betamethasonstimulierte Freisetzungsrate signifikant gesenkt. Während im Kurzzeitexperiment, sichtbar am deutlich hemmenden Effekt auf die Alaninfreisetzung (s.Abb.54, 55 und 74), offenbar die Insulinwirkung auf Transportvorgänge im Vordergrund steht, scheint unter längerem Hormoneinfluß die proteinanabole Wirkung des Hormons zu einer verminderten Bereitstellung der Aminosäure zu führen.

3. Entwicklung einer "Insulinresistenz" der Skelettmuskulatur nach mehrtägiger Glucocorticoidsubstitution adrenalektomiert-diabetischer Ratten

Auf vereinzelte Befunde der hemmenden Wirkung von Glucocorticoiden auf die insulinstimulierte Glucoseutilisation isolierter Muskelpräparate (Diaphragma, Herzmuskel) wurde bereits eingegangen (326,416-418). Als Ursache wurde sowohl ein Phosphorylierungsdefekt (414,418,419) als auch eine Hemmung des insulinstimulierten Membrantransports (416) nach mehrfacher Glucocorticoidapplikation diskutiert.
Wie die eigenen Untersuchungen an adrenalektomierten Ratten ergaben (siehe Abb.54), hat einmalige Betamethasonvorbehandlung keinen hemmenden Einfluß auf die insulinstimulierte Glucoseaufnahme des perfundierten Hinterkörpers. Diese Ergebnisse bestätigen sich in Experimenten mit adrenalektomiert-diabetischen Ratten (Abb.76,links). Trotz hochsignifikant unterschiedlicher basaler Glucoseaufnahmeraten der unbehandelten und betamethasonbehandelten Ratten, ist die Reaktion auf Insulinzusatz (+ ins: 0.5 mU/ml) zum Perfusionsmedium gleich (interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die Insulinwirkung nach einmaliger Betamethasonvorbehandlung in der Regel ausgeprägter ist (vgl. Abb.54) als bei unbehandelten Kontrolltieren). Unter diesen Bedingungen wird der intracelluläre Glucose-6-phosphatgehalt der Muskulatur signifikant, die freie Glucose- und Citratkonzentration im Durchschnitt leicht erhöht.
Nach mehrtägiger Substitution mit Betamethason (15o µg/1oo g KG x d über 3 Tage) ergibt sich ein verändertes Bild. Die gesteigerte Glucoseaufnahme durch die Muskulatur insulinsubstituierter Tiere (+ IL)(da die Perfusionen ohne Insulinzusatz erfolgten, spricht der Befund für eine "prolongierte Insulinprägung" des Muskelgewebes), wird durch gleichzeitige Betamethasonsubstitution (+ BL + IL) signifikant reduziert (Abb.76, rechts). Auffälliger Befund ist der hohe Anstieg des intracellulären Glucosegehaltes, der, in Übereinstimmung mit den oben erwähnten Untersuchungen am Diaphragma und



Muskelmetabolite

Glucose (µmol/ml$_{IC}$)	2.47 (± 0.51)	4.30 (± 1.30)	1.41 (± 0.62)	4.65 (± 1.42)	3.17 (± 0.68)	4.16 (± 0.58)	2.60 (± 0.37)	3.94 (± 0.47)	9.91 (± 1.06)
G-6-P (µmol/gFG)	0.235 (± 0.012)	0.362 (± 0.008)	0.233 (± 0.009)	0.414 (± 0.044)	0.219 (± 0.012)	0.288 (± 0.018)	0.183 (± 0.015)	0.189 (± 0.023)	0.305 (± 0.019)
Citrat (µmol/gFG)	0.175 (± 0.014)	0.257 (± 0.053)	0.160 (± 0.014)	0.210 (± 0.058)	0.167 (± 0.020)	0.216 (± 0.012)	0.129 (± 0.011)	0.128 (± 0.011)	0.131 (± 0.005)

Abb. 76: Glucoseaufnahme und Metabolite des M. gastrocnemius während Hinterkörperperfusionen gefütterter adrenalektomiert-diabetischer Ratten (ADX-DIAB) nach einmaliger (+ B) oder mehrtägiger Betamethasonvorbehandlung (+ BL), unter Insulinzusatz zum Perfusat (+ ins: 0.5 mU/ml) oder nach mehrtägiger Insulin-(+ IL) und Betamethason-Insulin-Substitution (+ BL + IL). Dosierungen wie in Abb. 75. Mittelwerte und s_{EM}.

Herzmuskel, auf eine Hemmung der Glucosephosphorylierung hindeutet. Der Effekt ist nicht zu erklären durch eine "Rückkopplungshemmung" infolge hoher Citrat- oder Glucose-6-phosphatkonzentrationen (siehe Abb.36), sondern könnte einer Herabsetzung der Hexokinasekapazität (im Sinne einer Reduzierung der Enzymkonzentration) entsprechen. Die Glucoseakkumulation unter gleichzeitiger Glucocorticoid- und Insulinsubstitution ist zumindest das Symptom eines Mißverhältnisses zwischen der Rate des insulinstimulierten Membrantransports und der intracellulären Glucoseutilisation. Ob zusätzlich die Insulinwirkung auf der Receptorebene eingeschränkt wird, kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht ent-

schieden werden.
Der Anstieg des intracellulären Glucosegehaltes ist nach alleiniger Betamethasonsubstitution (+ BL) nicht zu beobachten. Wie in Versuchen nach kurzfristiger Glucocorticoidapplikation, kann die reduzierte Glucoseaufnahme während dieser Perfusionen auf eine verminderte Transportrate zurückgeführt werden (unter der ein gleichzeitig bestehender Phosphorylierungsdefekt nicht erkennbar wird). Der in dieser Situation nur schwach ausgeprägte Effekt eines Insulinzusatzes zum Perfusionsmedium (+ ins: 0.5 mU/ml) spricht für eine Abnahme der Transportkapazität für Glucose und/oder eine Veränderung der receptorvermittelten Signalübertragung auf die Zellmembran. Anhaltspunkte für die Beeinflussung beider Prozesse geben verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre: aus Veränderungen des Glucosetransports in Thymocyten wurde auf eine glucocorticoidabhängige Regulation der effektiven Carrierzahl geschlossen (624), und auf die Veränderung der Insulinbindungskapazität und -affinität von Hepatocyten und Adipocyten adrenalektomierter und glucocorticoidbehandelter Ratten wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen hingewiesen (446, 457-459).

Eine grundlegende Änderung von Transporteigenschaften der Muskelfasermembran nach mehrtägiger Betamethasonbehandlung adrenalektomiert-diabetischer Ratten läßt sich auch aus der Analyse des Alaningehaltes und -effluxes ableiten (Abb.77). Während einmalige Betamethasonapplikation(+B,links) zu einem Anstieg der intracellulären Alaninkonzentration führt, kommt es nach mehrtägiger Substitution (+BL,rechts), bei anhaltend hoher Effluxrate der Aminosäure, zu einem erheblichen Abfall des Muskelalaningehaltes. Insulinzusatz zum Perfusionsmedium (+ ins: 0.5 mU/ml) hat in dieser Situation nicht mehr den sonst senkenden Effekt auf die hohe Effluxrate; die Intracellulärkonzentration der Aminosäure wird (möglicherweise als Folge einer erhöhten Pyruvatverfügbarkeit) leicht gesteigert.
Kombinierte Betamethason- und Insulinsubstitution (+ BL + IL) resultiert in einer "Normalisierung" des Muskelalaninge-

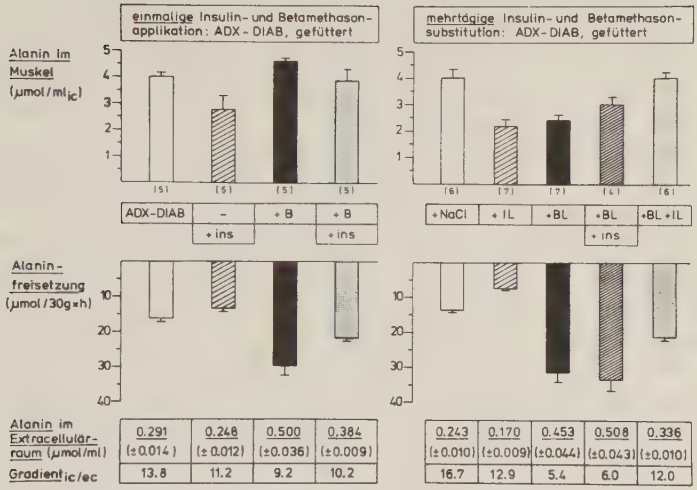


Abb.77: Alaninkonzentration im Muskelzellwasser und Alaninfreisetzung während Hinterkörperperfusionen gefütterter adrenalektomiert-diabetischer Ratten (ADX-DIAB) nach einmaliger (+ B) oder mehrtägiger Betamethasonvorbehandlung (+ BL), unter Insulinzusatz zum Perfusat (+ ins: 0.5 mU/ml) oder nach mehrtägiger Insulin-(+ IL) und Betamethason-Insulin-Substitution (+ BL + IL). Dosierungen wie in Abb.75.
Mittelwerte und s_{EM}.

haltes und der Freisetzungsrate. Der im Vergleich zu den sonstigen Bedingungen (+ins,+ IL) "paradoxe Insulineffekt" auf die intracelluläre Alaninkonzentration kann nicht mit einer Steigerung der Alaninsynthese erklärt werden; der gegenüber Versuchen mit alleiniger Betamethasonsubstitution (+ BL) erfolgende Anstieg des Konzentrationsgradientens über die Zellmembran weist auf die Förderung eines Transportprozesses hin, der durch Glucocorticoide negativ beeinflußt wird. Gemeinsame Wirkungsebene beider Hormone könnte die quantitative Modulation von Proteinkomponenten des influxregulierenden A-Systems sein, deren Netto-Synthese durch

Insulin gesteigert (612, 323, 63o) und möglicherweise durch Glucocorticoide vermindert wird (322). Der Befund der extrem unterschiedlichen Freisetzungsraten bei gleicher intracellulärer Alaninkonzentration in Experimenten mit isolierter Substitution von Insulin (+ IL) und Betamethason (+ BL) spricht für diese Hypothese.
Die Versuchsergebnisse zeigen zugleich den unterschiedlichen Effekt beider Hormone auf die Richtung des Aminosäurenflusses in der Muskulatur: während einseitiges Übergewicht des Insulins (+ IL) zu einer Aminosäurenverlagerung vom Extracellulärraum in das Proteinreservoir des Muskels führt (gleichzeitiges Absinken der extracellulären und intracellulären Alaninkonzentration), haben Glucocorticoide (+ BL) einen entgegengerichteten Effekt (starker Anstieg der extracellulären unter Abnahme der intracellulären Alaninkonzentration; aufgrund der anhaltend hohen Effluxrate kann, trotz gesteigerter Proteinabbaurate und de-novo-Alaninsynthese, der Gehalt der Aminosäure im Zellwasser nicht aufrechterhalten werden). Erst das Zusammentreffen beider Hormonwirkungen (+ BL + IL) erlaubt durch den Antagonismus auf der Ebene des Aminosäurentransports und Proteinumsatzes die Einstellung des "normalen Alaningehaltes" und der "normalen Freisetzungsrate".

Zusammenfassung

Die pathophysiologische Funktion der Glucocorticoide bei der Entwicklung der Hyperglykämie im Insulinmangel und die physiologische Relevanz dieser Hormone für die normale Glucosehomöostase wird in Untersuchungen adrenalektomiert-diabetischer Ratten deutlich.
Die unsubstituierten Tiere, die im Futterzustand die typische diabetische Hyperglykämie aufweisen, entwickeln nach Nahrungsentzug eine Hypoglykämie, die durch Glucocorticoidgabe zu verhindern ist.
Die Grundlage der auffallenden Störung der Glucosehomöostase ist in Veränderungen des Muskelstoffwechsels zu sehen. Die Glucoseutilisation durch die Muskulatur dieser Ratten ist

gegenüber diabetischen Tieren erhöht, die Freisetzung des Gluconeogenesevorläufers Alanin erniedrigt. Die Adaptation der Aminosäurenfreisetzung an den gesteigerten Gluconeogenesebedarf im Hungerzustand ist aufgehoben. Glucocorticoidsubstitution erniedrigt die Glucoseutilisation und erhöht die Alaninfreisetzung; es resultiert der Stoffwechselzustand der diabetischen Ratte.
Ein Vergleich verschiedener Tierkollektive und Substitutionsexperimente mit adrenalektomiert-diabetischen Ratten zeigen, daß die Alaninfreisetzung aus der Muskulatur der Kontrolle durch Glucocorticoide und Insulin unterliegt. Der Antagonismus beider Hormone auf den Aminosäurentransport und Proteinumsatz bleibt unter kombinierter Substitution nachweisbar; er kann als Voraussetzung für die normale de-novo-Synthese und Freisetzungsrate von Alanin und die Aufrechterhaltung des intracellulären Alaningehaltes des Muskels angesehen werden. Im Futterzustand scheint die kombinierte Wirkung beider Hormone eine "Speicherfunktion" zu erfüllen (Abb. 78). Unter Rückgang der Insulinwirkung nach Nahrungsentzug und Hervorhebung der Glucocorticoidkomponente kommt es zu einem gesteigerten Alaninefflux in den Extracellulärraum. Durch die gleichzeitige Zunahme der Aminosäurenbereitstellung aus Muskelproteinen und der Förderung der Alaninsynthese wird dabei der intracelluläre Alaninpool weitgehend konstant gehalten. Verschiedene Befunde deuten darauf hin, daß mehrtägige Glucocorticoidsubstitution die Transport- und Phosphorylierungskapazität für Glucose im diabetischen Muskel herabsetzt. Ein gleicher Effekt scheint auch das System des Alanintransports in die Muskulatur zu betreffen. Insulin hebt die Glucocorticoidwirkung nicht auf, modifiziert jedoch ihre quantitative Ausprägung, indem es die erwähnten Prozesse in entgegengesetzter Weise beeinflußt.

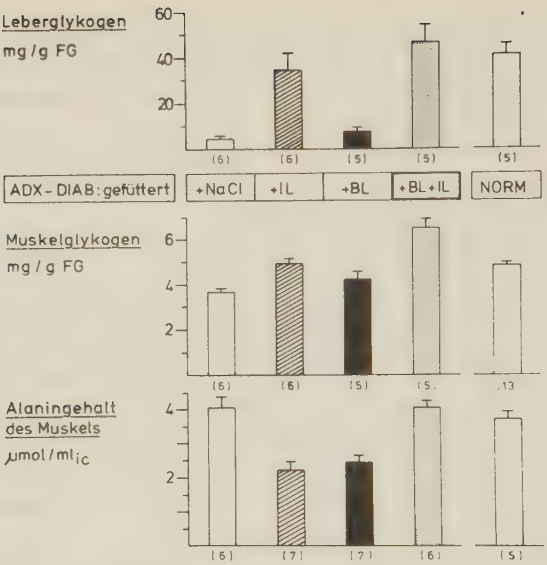


Abb.78: Synergistische Phänomene der Glucocorticoid- und Insulinwirkung bei gefütterten adrenalektomiert-diabetischen Ratten.
Leber- und Muskelglykogengehalt ("Glucosespeicher" des Organismus) und die intracelluläre Alaninkonzentration der Muskulatur ("Alaninspeicher" des Organismus) werden durch beide Hormone reguliert. Im Falle des Alanins ergibt sich der "Synergismus" wahrscheinlich durch die antagonistischen Effekte der Hormone auf den Proteinumsatz und den Aminosäurentransport (nach Ausschaltung beider Hormone (ADX-DIAB) resultiert ein labiler, "pseudo-normaler" Zustand).
Mittelwerte und s_{EM}. Substitutionen (IL/BL): s.Abb.76/77.

C. Untersuchungen zum Mechanismus der Glucocorticoidwirkung auf die Muskulatur

Der Übertragungsmechanismus des Glucocorticoidsignals auf den Stoffwechsel der Skelettmuskulatur ist bisher unbekannt. Die Anwesenheit von Glucocorticoidreceptoren in diesem Gewebe (275-279, 237, 617, 618, 37o) verleitet dazu, das bekannte "Induktionsmodell" der Steroidhormonwirkung (237, 631)

als Erklärung der Hormoneffekte heranzuziehen. Hinweise auf die Beteiligung von Induktionsvorgängen an der Ausprägung der Glucocorticoidwirkungen auf den Muskelstoffwechsel stehen jedoch aus. Die Aktivität von Enzymen, deren Zunahme in der Leber auf eine Induktion zurückgeführt wird (Tryptophan-oxygenase, Tyrosinaminotransferase: 632, 633), wird durch mehrtägige Glucocorticoidgabe in der Muskulatur nicht verändert (278). Gleiches gilt für andere Enzyme, wie die Alanin- und Aspartataminotransferase (278, 52), die Glutamatdehydrogenase oder die NADP-abhängige Malatdehydrogenase (52). Ein Aktivitätsanstieg der "myofibrillären Protease" (278), der möglicherweise mit einem Induktionsvorgang zu korrelieren wäre, konnte in Untersuchungen unseres Arbeitskreises nicht bestätigt werden (siehe Tab.11); auch bezüglich einer Zunahme der "Branched-Chain-Amino-transferase"-Aktivität liegen widersprüchliche Befunde vor (52, 51o). Für eine Reihe weiterer Enzyme wurde ein Aktivitätsverlust nach langfristiger, hochdosierter Glucocorticoidbehandlung beschrieben (429). Insgesamt sprechen bisher vorliegende Ergebnisse mehr für eine glucocorticoidbedingte allgemeine Inhibierung als für eine Aktivierung spezifischer Proteinsyntheseprozesse in der Muskulatur.

1. Zeitliches Auftreten der Glucocorticoidwirkung auf die Skelettmuskulatur

Perfusionsexperimente zur Darstellung des zeitlichen Auftretens der Glucocorticoideffekte auf die Alaninfreisetzung und Glucoseutilisation des Muskels ergaben eine Latenzperiode der Hormonwirkung von 1 - 2 Stunden (Abb.79).
Der bei den Untersuchungen beobachtete Zeitraum der "lag-Phase" stimmt weitgehend mit den Verhältnissen an eviscerierten Ratten (271), isolierten Diaphragmen (321, 322) und anderen Geweben (48o, 481, 265, 626, 486, 213) überein. Er kann möglicherweise mit der Halbwertszeit von Proteinen zusammenhängen, deren Synthese oder Abbau durch Glucocorti-

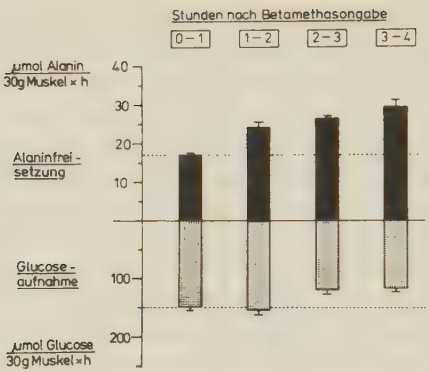


Abb.79: Zeitliches Auftreten der Glucocorticoideffekte auf die Glucoseutilisation und Alaninfreisetzung durch den Hinterkörper 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten. Die Betamethasonvorbehandlung (5oo µg/1oo g KG) erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Perfusion (O - 1 h: 1 mg/dl Betamethasonzusatz zum Perfusat).
Mittelwerte und s_{EM}. Signifikante Effekte auf die Alaninfreisetzung sind nach 1 h, auf die Glucoseutilisation nach 2 h festzustellen.
Mittelwerte und s_{EM}.

coide reguliert wird und deren quantitative Veränderung eine Grundlage der Hormonwirkung darstellt. Anhaltspunkte dafür ergaben sich in den Untersuchungen an adrenalektomiert-diabetischen Ratten.

An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, daß die verzögerte Wirkung des Hormons auf die Glucoseutilisation des Muskels nicht durch "indirekte Effekte" (beispielsweise als Folge einer in vivo eingetretenen Lipolyse) zu erklären ist.

2. Manifestation der Glucocorticoidwirkung ohne Änderung des Energiestatus der Muskulatur

Aus früheren Untersuchungen an Thymocyten und lymphocytärem Gewebe wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen glucocorticoidbedingter Glucoseutilisationshemmung, verminderter ATP-Bildung und den Veränderungen des Protein-, RNA- und

DNA-Stoffwechsels abgeleitet (636-638).
In den vorliegenden Perfusionsversuchen ist ein solcher Zusammenhang nicht festzustellen. Der frühe Zeitpunkt der gesteigerten Alaninfreisetzung (vor Einsetzen der Glucoseutilisationshemmung) und die nach Glucocorticoidgabe unveränderten Konzentrationen energiereicher Phosphate (Tab.25) sprechen gegen die Übertragbarkeit dieses "Wirkungsmodells" auf die Verhältnisse in der Skelettmuskulatur.

	Muskelgehalt (µmol/g FG) nach 60 min Perfusion			
	CP	ATP	ADP	AMP
NORM (5)	21.79 (±0.90)	7.83 (±0.09)	0.875 (±0.022)	0.031 (±0.003)
ADX (8)	20.55 (±0.67)	7.37 (±0.11)	0.833 (±0.029)	0.036 (±0.003)
ADX + B (8)	21.44 (±0.45)	7.81 (±0.09)	0.875 (±0.018)	0.033 (±0.004)
ADX + BL (4)	22.13 (±0.44)	7.88 (±0.18)	0.830 (±0.042)	0.035 (±0.005)

Tab.25: Creatinphosphat und Adeninnucleotide im M. gastrocnemius am Ende von Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter intakter (NORM) und adrenalektomierter (ADX) Ratten mit einmaliger (ADX + B: 5oo µg/1oo g KG) und mehrtägiger (ADX + BL: 2 x 1oo µg/1oo g KG x d) Betamethasonsubstitution. Gleiche Ergebnisse sind auch nach einmaliger Betamethasongabe an adrenalektomiert-diabetischen Ratten zu messen.
Mittelwerte und s_{EM}.

Ein erwähnenswerter Befund ist die signifikante Abnahme des Sauerstoffverbrauches nach mehrtägiger Betamethasonsubstitution (Tab.26); er ist möglicherweise mit Befunden zu korrelieren, die für eine Veränderung der Mitochondriendichte und -funktion (35o, 634) und eine verminderte "oxidative Kapazität" des Muskelgewebes (635) nach längerer Corticosteroidapplikation sprechen. Auch unter den Bedingungen der reduzierten Sauerstoffaufnahme zeigt jedoch

der "Energiestatus" der ruhenden Skelettmuskulatur keine Abweichung vom Normalbefund.

		Sauerstoffverbrauch µmol/30g × min
NORM	(12)	15.42 (± 0.38)
ADX	(8)	14.02 (± 0.59)
ADX+ B	(8)	14.72 (±0.63)
ADX+ BL	(6)	11.25 (± 0.51)

Tab.26: Reduzierter Sauerstoffverbrauch während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten nach fünftägiger Behandlung mit Betamethason (+ BL: 2 x 1oo µg/1oo g KG x d).
Mittelwerte und s_{EM}.

3. Hinweise auf eine post-transcriptionelle Kontrolle der Aminosäurenverfügbarkeit des Muskels durch Glucocorticoide

Um die Abhängigkeit der Glucocorticoidwirkung auf die Alaninfreisetzung und Glucoseutilisation der Muskulatur von Mechanismen der Transcription und Translation zu überprüfen, wurden Untersuchungen nach Actinomycin D- und Cycloheximid-Vorbehandlung der Ratten durchgeführt. Die Hemmsubstanzen wurden den Tieren 30 min vor der Betamethasonapplikation intraperitoneal injiziert; die verwendeten hohen Dosen (2 mg/kg Actinomycin D und 2o mg/kg Cycloheximid) sollen nach Untersuchungen anderer Autoren zu einer wirkungsvollen Hemmung der RNA-(Actinomycin D) und Proteinsynthese (Cycloheximid) führen (592, 598, 153).
Wie die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen (Abb.8o),

bleiben nach Actinomycin D-Vorbehandlung die typischen Glucocorticoidwirkungen auf den Muskelstoffwechsel erhalten.

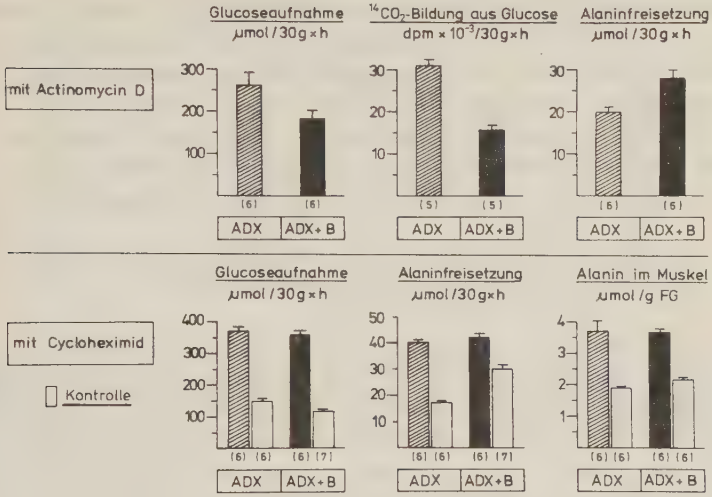


Abb.8o: Einfluß von Actinomycin D und Cycloheximid auf die Glucocorticoidwirkungen in der Skelettmuskulatur. Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter adrenalektomierter Ratten ohne (ADX) und mit einmaliger Betamethasonvorbehandlung (ADX + B: 5oo µg/1oo KG, 3.5 h vor der Perfusion). Die intraperitoneale Injektion des Transcriptionshemmers Actinomycin D (2 mg/kg KG) und des Translationshemmers Cycloheximid (2o mg/kg KG) erfolgte 4 h vor der Perfusion (3o min vor Betamethasonapplikation). Mittelwerte und s_{EM}.

Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid führt dagegen zur Aufhebung der Hormoneffekte auf die Alaninfreisetzung und Glucoseutilisation. Die extreme Steigerung der basalen Freisetzungsrate von Alanin, die verbunden ist mit einer hohen Akkumulation der Aminosäure in der Muskulatur, spricht für eine starke Zunahme der de-novo-Alaninsynthese unter diesen Bedingungen. Der Befund weist erneut auf die enge Beziehung hin, die zwischen Änderungen der intracellulären Aminosäurenverfügbarkeit und Alaninbildung des

Muskels besteht.
Zusammenfassend kann aus diesen Versuchen geschlossen werden, daß die in der Arbeit dargestellten Glucocorticoideffekte durch eine Hemmung der Proteinsynthese auf der Ebene der Translation vermittelt werden. Die kürzlich von anderen Autoren diskutierte Induktion eines "inhibitory regulator" der Proteinsynthese (334) ist, wie die Untersuchungen mit Actinomycin D zeigen, wahrscheinlich nicht erforderlich.

4. Einfluß der Glucocorticoide auf den prozentualen Anteil von Glucosekohlenstoff im Alanin

Im Zusammenhang mit der Besprechung des "Glucose-Alanin-Zyklus" wurde bereits auf den quantitativen Stellenwert des Glucosekohlenstoffs für die basale Rate der de-novo-Alaninsynthese in der Muskulatur hingewiesen. Eine genaue Angabe des prozentualen Anteils exogenen Glucosekohlenstoffs an der Alaninbildung ist bisher jedoch nicht möglich; die von verschiedenen Autoren gemessenen oder kalkulierten Werte variieren zwischen 29% und 97% für Ratten (78, 81, 311, 496, 492) und zwischen 67% und 72% für den Menschen (68). In eigenen Untersuchungen, in denen der Einbau von (U-^{14}C) Glucosekohlenstoff in Alanin untersucht wurde, ist die spezifische Aktivität des freigesetzten Alanins nach Adrenalektomie leicht erhöht und nach einmaliger Betamethasoninjektion signifikant vermindert (Abb.81). Die quantitative Analyse des ^{14}C-Einbaus ergibt, daß bei 24 h-gehungerten intakten Ratten etwa 86%, bei adrenalektomierten Ratten etwa 95% und bei betamethason-behandelten Ratten etwa 66% des Alanins aus exogener Glucose entsteht. Der absolute Anteil des Glucosekohlenstoffs an der de-novo-Alaninsynthese bleibt unter den verschiedenen Versuchsbedingungen mit rund 17 - 18 µmol/3o g Muskulatur x h weitgehend konstant (er entspricht etwa 6 - 10% der aufgenommenen Glucosemenge).
Die Modulation der Alaninfreisetzung erfolgt damit nicht

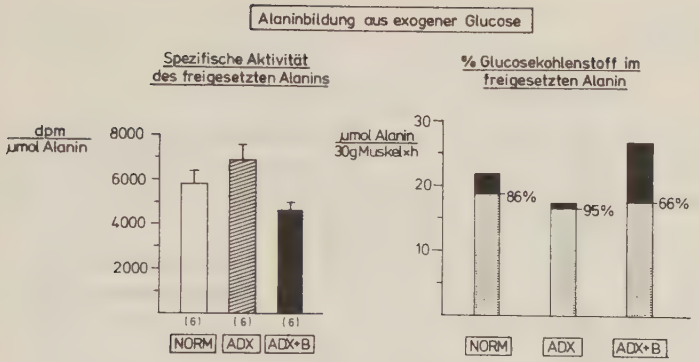


Abb.81: Spezifische Aktivität des freigesetzten Alanins und prozentuale Alaninbildung aus exogener Glucose während Hinterkörperperfusionen 24 h-gehungerter intakter (NORM), adrenalektomierter (ADX) und einmalig betamethason-vorbehandelter Ratten (ADX + B: 5oo µg/1oo g KG, 3 - 4 h vor der Perfusion).
Die spezifische Aktivität des Alanins wird durch Zunahme des prozentualen Anteils unmarkierten Kohlenstoffs durch Glucocorticoide signifikant reduziert. Die Berechnung der Prozentanteile des Glucosekohlenstoffs an der Alaninbildung erfolgte aus den Mittelwerten von je 5 Versuchen.

über den Glucoseanteil, sondern durch die Zu- oder Abnahme unmarkierten Kohlenstoffs in der Alaninfraktion. Die Bereitstellung dieses Kohlenstoffs aus endogenen Quellen der Muskulatur ist, wie die Unterschiede zwischen den Versuchsreihen zeigen, abhängig von der Anwesenheit der Glucocorticoide; wie im Verlauf der Arbeit dargestellt wurde, ermöglicht die Wirkung dieser Hormone eine erhöhte Alaninsynthese aus Kohlenstoffskeletten anderer Aminosäuren und eine vermehrte Freisetzung von Alanin aus Muskelproteinen. Unter dem Einfluß der Glucocorticoide wird auf diesem Wege, neben der Glucosekonservierung durch Lactatbildung und glucoseabhängige Alaninsynthese, die Netto-Gluconeogenese der Leber gesteigert.

V. Synopsis

In Perfusionsexperimenten mit dem isolierten Rattenhinterkörper werden hormonelle und autoregulative Mechanismen dargestellt, die der Anpassung des Muskelstoffwechsels an Gluconeogenesesituationen zugrundeliegen.
Die Ergebnisse der Versuche zeigen, daß die normale Glucosebereitstellung nach Nahrungsentzug an Glucocorticoidwirkungen auf die Skelettmuskulatur gebunden ist. Wichtige physiologische Bedeutung kommt der "permissiven" Wirkung dieser Hormone auf die muskuläre Alaninsynthese und -freisetzung zu, die im Hungerzustand zu einer Verlagerung von proteinogenem Kohlenstoff in die Leber führt. Gleichzeitig wird die Glucoseutilisation der Muskulatur durch Glucocorticoide eingeschränkt. Die quantitative Ausprägung beider Effekte steht unter der Kontrolle von Insulin. Im Insulinmangel sind die Glucocorticoidwirkungen von pathophysiologischer Relevanz; sie bilden eine wesentliche Grundlage für die gesteigerte Gluconeogenese und Hyperglykämie der hungernden diabetischen Ratte.
Im einzelnen sind aus den vorliegenden Untersuchungen folgende neue oder bisher unzureichend geklärte Aspekte der nahrungsabhängigen Regulation des Muskelstoffwechsels abzuleiten:

1. Typisches Merkmal der Stoffwechselanpassung der Muskulatur an die verminderte Glucoseverfügbarkeit nach Nahrungsentzug ist die Zunahme der Lactat- und Alaninfreisetzung. Durch Vergleich verschiedener Tierkollektive (normale, adrenalektomierte, adrenalektomiert-diabetische und diabetische Ratten) läßt sich nachweisen, daß die Effektivität der Glucosebereitstellung in vivo nicht so sehr mit der Lactat- als vielmehr mit der Alaninfreisetzung aus dem Muskelgewebe korreliert; diese ist abhängig vom Vor-

handensein physiologischer Glucocorticoidkonzentrationen (Abb.82).

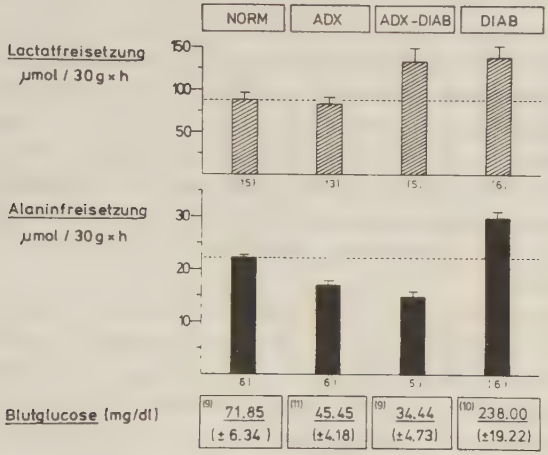


Abb.82: Lactat- und Alaninfreisetzung durch die Hinterkörpermuskulatur 24 h-gehungerter Ratten und Glucosehomöostase in vivo. Die Blutglucosekonzentration korreliert mit der Größe der Alaninbereitstellung aus dem Muskelgewebe.

2. Ein überwiegender Teil des freigesetzten Alanins wird im Intermediärstoffwechsel der Muskulatur in der Glutamat-Pyruvat-Transaminasereaktion synthetisiert. Obwohl Glucosekohlenstoff die Basis dieser "de-novo-Alaninsynthese" bildet, ist bei hungernden Normaltieren durch einseitige Steigerung der glykolytischen Pyruvatverfügbarkeit (durch artifizielle Steigerung der Glucose-, Lactat- und Pyruvatutilisation des Muskels oder als Folge von Muskelarbeit) keine wirkungsvolle Stimulation der Alaninfreisetzung zu erzielen. Die Befunde sprechen gegen das herkömmliche Konzept des "Glucose-Alanin-Zyklus" als Erklärung für die Modulation der Alaninbereitstellung aus der Skelettmuskulatur. Modelluntersuchungen mit Aminosäurenzusätzen

zum Perfusionsmedium zeigen dagegen, daß die Steigerung der Alaninsynthese an das vermehrte Angebot bestimmter, im Muskel metabolisierbarer Aminosäuren gebunden ist. Den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin kommt dabei eine Schlüsselfunktion zu. Neben dem Transaminierungsprodukt Glutamat entsteht beim Abbau dieser Aminosäuren Pyruvat, das zu Alanin aminiert und freigesetzt wird. Die durch eine Änderung des Proteinumsatzes erfolgende Zunahme dieser Aminosäuren ist, verbunden mit einer gleichzeitigen Hemmung des oxidativen Pyruvatabbaus, als Grundlage der erhöhten Alaninbildung nach Nahrungsentzug anzusehen.

3. Die Anpassung der muskulären Alaninfreisetzung an den aktuellen Gluconeogenesebedarf basiert auf der Interaktion von Glucocorticoiden und Insulin. Die regulative Bedeutung beider Hormone ergibt sich aus ihrer gegensätzlichen Wirkung auf den Proteinumsatz, die Pyruvatoxidation und den Alanintransport der Muskulatur.
Während die Zunahme der Alaninfreisetzung nach Nahrungsentzug mit der Abnahme der Insulinwirkung zu korrelieren ist, wird die absolute Größe der sich einstellenden Freisetzungsrate von der Anwesenheit der Glucocorticoide bestimmt. Im akuten Substitutionsexperiment mit adrenalektomierten Ratten beruht der alaninsteigernde Glucocorticoideffekt wahrscheinlich auf einer direkten Hemmung der Proteinsynthese; nach Vorbehandlung mit dem Synthesehemmer Cycloheximid bleibt die Hormonwirkung aus und wird gleichzeitig imitiert. Die Zunahme der Alaninsynthese unter diesen Bedingungen kann, entsprechend dem oben dargestellten Mechanismus, auf die erhöhte intracelluläre Verfügbarkeit von Aminosäuren zurückgeführt werden, die in den Intermediärstoffwechsel der Muskulatur einmünden. Das unter Glucocorticoideinfluß auf diesem Wege vermehrt entstehende und freigesetzte Alanin enthält Kohlenstoff, der nicht dem Abbau exogener Glucose, sondern endogenen

Quellen der Muskulatur entstammt. Bei der glucoplastischen Umwandlung in der Leber führt dieser Anteil der Alaninfraktion zu einer Nettoproduktion von Glucose.

4. Die glucocorticoidabhängige Zunahme der Bereitstellung von Alanin und anderen Aminosäuren ist begleitet von einem Rückgang der Glucoseutilisation durch die Muskulatur. Der bisher umstrittene Hormoneffekt ist besonders deutlich im Insulinmangel und nach mehrtägiger Glucocorticoidsubstitution adrenalektomierter Ratten nachzuweisen. Verschiedene Befunde sprechen dafür, daß sowohl der

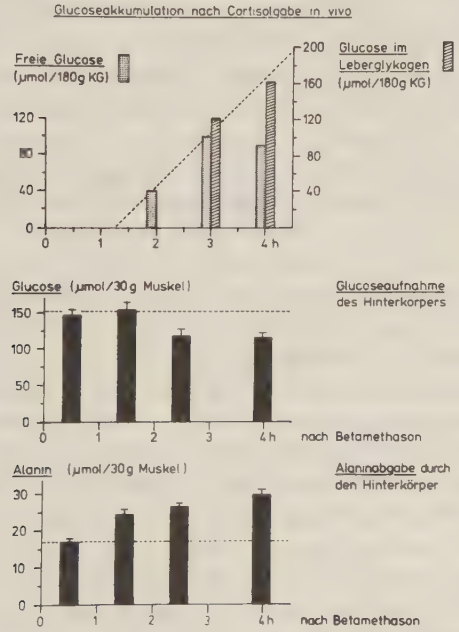


Abb.83: Zeitliche und quantitative Korrelation zwischen der Kohlenhydratanreicherung in vivo und den Wirkungen der Glucocorticoide auf die Glucoseutilisation und Alaninfreisetzung durch die Muskulatur des isolierten Rattenhinterkörpers.

Glucosetransport als auch der glykolytische und oxidative Glucoseabbau durch Glucocorticoide herabgesetzt wird. Die dadurch bedingte Glucoseeinsparung ist quantitativ eine Voraussetzung für die seit langem bekannte, typische Kohlenhydratanreicherung (Anstieg der freien und glykogengebundenen Glucose) nach Glucocorticoidapplikation (Abb. 83).

5. Die dargestellten Glucocorticoidwirkungen, die bei erhaltener Insulinsekretion am adrenalektomierten Tier zu einer Wiederherstellung der zuvor gestörten Glucosehomöostase führen, haben im Insulinmangel pathophysiologische Bedeutung.
   Die an adrenalektomiert-diabetischen Ratten nach Nahrungsentzug eintretende Hypoglykämie ist verbunden mit einer hohen Glucoseaufnahme und geringen Alaninfreisetzung durch die Muskulatur. Bereits nach einmaliger Glucocorticoidgabe resultiert unter Hemmung der Glucoseutilisation und erheblicher Zunahme der Alaninsynthese und -freisetzung die Stoffwechselsymptomatik der diabetischen Ratte.
   Mehrtägige Glucocorticoidsubstitution führt zu einer "Insulinresistenz", die sowohl die Steigerung der Glucoseaufnahme als auch die Hemmung der Alaninfreisetzung durch Insulin betrifft. Untersuchungen nach kombinierter Insulin-Glucocorticoid-Substitution sprechen dafür, daß die Hormone unabhängig nebeneinander wirksam sind und ihre gegensätzlichen Einzeleffekte sich überlagern. Die Einstellung des intracellulären Alaningehaltes, der Alaninfreisetzungsrate und der Glucoseutilisation erscheint als Resultante der Wirkung beider Hormone. Als eine in dieser Beziehung wichtige gemeinsame Wirkungsebene kann die Umsatzregulation von Komponenten der Membrantransportsysteme für Glucose und Alanin angesehen werden.

Unter Zusammenfassung der dargestellten Ergebnisse sind folgende Schwerpunkte der für die Glucosehomöostase bedeutsamen

Glucocorticoidwirkungen auf den Muskelstoffwechsel zu nennen (Abb.84):

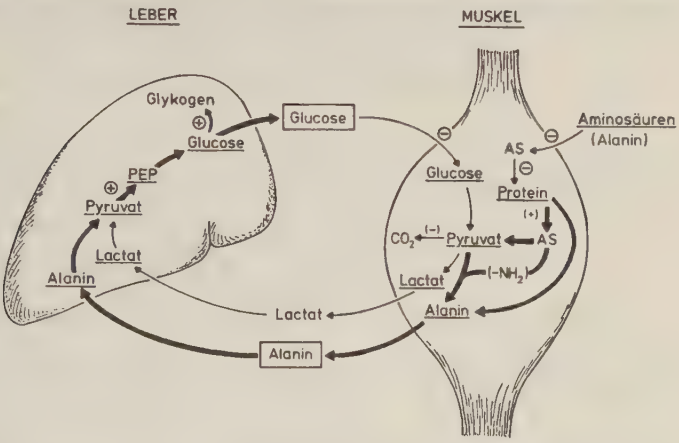


Abb.84: Schematische Darstellung der Glucocorticoidwirkungen auf die Skelettmuskulatur und ihre Beziehung zur Glucosehomöostase des Organismus.

1. der Proteinumsatz: durch Steigerung des Netto-Proteinabbaus (durch Hemmung der Proteinsynthese und/oder Zunahme der Proteolyse) wird die Verfügbarkeit freier Aminosäuren erhöht und die aminosäurenabhängige, nicht-glykolytische de-novo-Alaninsynthese stimuliert;
2. der Aminosäurentransport: durch Einschränkung der Aminosäurenaufnahme in die Muskulatur wird die extracelluläre Akkumulation freigesetzten Alanins und sein Transport zur Leber begünstigt;
3. der Glucosetransport und die intracelluläre Glucoseutilisation: durch Hemmung der Glucoseaufnahme und des Glucoseabbaus wird die extracelluläre Glucoseverfügbarkeit zugunsten glykolyseabhängiger Gewebe erhöht.

Die Manifestation der Glucocorticoideffekte ist abhängig vom Insulin/Glucocorticoid-Verhältnis; unter Zunahme der Insulin-

wirkung wird die Glucoseutilisation gesteigert, der Nettoefflux von Alanin herabgesetzt und durch Stimulation des Aminosäureneinbaus in Muskelproteine der dargestellte Mechanismus der de-novo-Alaninsynthese inhibiert.

Literaturverzeichnis

1. CHINN, K.S.K., and J.P. HANNON:
Relationship of muscle protein to other components of the fat-free mass.
Am.J. Physiol. 211 (1966), 993-997

2. FORBES, R.M., A.R. COOPER, and H.H. MITCHELL:
The composition of the adult human body as determined by chemical analysis.
J.Biol. Chem. 203 (1953), 359-366

3. YOUNG, V.R.: The role of skeletal and cardiac muscle in the regulation of protein metabolism. In "Mammalian Protein Metabolism" - Vol.IV; ed.by H.N. MUNRO.
Academic Press, New York, London (1970), 585-674

4. KRAMER, K.: Energieumsatz des Menschen bei Muskelarbeit.
In "Physiologie des Menschen - Band 4: Muskel";
Hrsg. W. HASSELBACH und K. KRAMER.
Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien (1975), 131-168

5. ROSELL, S., and B. SALTIN:
Energy need, delivery, and utilization in muscular exercise. In "The Structure and Function of Muscle. Vol.III: Physiology and Biochemistry"; ed. by G.H. BOURNE.
Academic Press, New York, London (1973), 185-221

6. WAHREN, J., P. FELIG, G. AHLBORG, and L. JORFELDT:
Glucose metabolism during leg exercise in man.
J.Clin.Invest. 50 (1971), 2715-2725

7. CAHILL, G.F. jr.: Metabolic role of muscle.
In "Muscle Metabolism During Exercise";
ed. by B. PERNOW and B. SALTIN.
Plenum Press, New York, London (1971), 103-109

8. CAHILL, G.F. jr., T.T. AOKI, and A.A. ROSSINI:
Decreased gluconeogenesis in man. In "Regulation of Hepatic Metabolism"; ed. by F.LUNDQUIST and N.TYGSTRUP. Munksgaard,Copenhagen (1974), 683-694

9. RUDERMAN,N.B., M.BERGER, S.HAGG, S.TAYLOR, M.N.GOODMAN, and E.MAIZELS:
Muscle Glucose Metabolism in Starvation. In "Muskelstoffwechsel, körperliche Leistungsfähigkeit und Diabetes mellitus";
hrsg. von K. JAHNKE, H. MEHNERT und H.E. REIS.
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York (1977), 81-87

10. KEUL, J.:
Muscle metabolism during long lasting exercise. In "Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise"; ed. by H.HOWALD and J.R.POORTMANS.
Birkhäuser Verlag, Basel (1975), 31-42

11. LÖFFLER, G. und L. WEISS: Die Stoffwechselwirkungen des Insulins.
In "Handbuch der inneren Medizin"; hrsg. von H. SCHWIEGK.
7. Band, Teil 2 A: Diabetes mellitus - A; hrsg. von K.OBERDISSE.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1975), 249-303

12. LECLERCQ-MEYER, V. und W.J. MALAISSE:
Die Stoffwechselwirkungen des Glukagon. ibid., 409-438

13. HASSELBLATT, A.:
Stoffwechselwirkungen der Katecholamine. ibid., 503-520

14. ZIMMERMANN, H.: Die Wirkungen der Corticosteroide auf den Kohlenhydratstoffwechsel. ibid., 473-502

15. STEELE, R.: Influences of corticosteroids on protein and carbohydrate metabolism. In "Handbook of Physiology - Endocrinology VI: Adrenal Gland"; ed. by H. BLASCHKO, G. SAYERS and A.D. SMITH. American Physiological Society, Washington, D.C. (1975), 135-167

16. FAIN, J.N., and M.P. CZECH: Glucocorticoid effects on lipid mobilization and adipose tissue metabolism. ibid., 169-178

17. CAHILL, G.F. jr.: Physiology of insulin in man. Diabetes 20 (1971), 785-799

18. GROTE, E.: Zentralnervöse Regulation und Dysregulation der Glukosehomöostase beim Menschen. Habilitationsschrift, Giessen (1976)

19. BRODOWS, R.G., F.X.PI-SUNYER, and R.G. CAMPBELL: Sympathetic control of hepatic glycogenolysis during glucopenia in man. Metabolism 24 (1975), 617-624

20. OTTOLENGHI, C., A. CANIATO, R. MANSERVIGI, and O. BARNABEI: Carbamylcholine and insulin control of glycogenesis in the isolated perfused rat liver. In: "Isolated Liver Perfusion and Its Applications"; ed. by I. BARTOŠEK, A. GUAITANI, and L.L. MILLER. Raven Press, New York (1973), 179-185

21. BLOOM, S.R.: Blood glucose control by direct islet innervation. Horm. Metab. Res., Suppl. 6: "Hypoglycemia" Georg Thieme Publishers, Stuttgart (1976), 85-90

22. LEHNINGER, A.L.: Biochemistry. 28. Active transport across membranes; Worth Publishers, New York (1975), 779-805

23. WYNN, C.H.: "The Structure and Function of Enzymes". 4. Factors affecting enzyme activity. Edward Arnold, London (1973), 39-49

24. NEWSHOLME, E.A., and C.START: "Regulation in Metabolism". 2. Molecular mechanisms in the regulation auf enzyme activity. John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto (1973), 34-87

25. FRIEDRICHS, D.: Zur Regulation der Gluconeogenese. Habilitationsschrift, Giessen (1976)

26. AIKAWA, T., H. MATSUTAKA, K. TAKEZAWA, and E. ISHIKAWA: Gluconeogenesis and amino acid metabolism. I. Comparison of various precursors for hepatic gluconeogenesis in vivo. Biochim. Biophys. Acta 279 (1972), 234-244

27. ROSS, B.D., R. HEMS, and H.A. KREBS: The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. Biochem. J. 102 (1967), 942-951

28. SNELL, K., and D.G. WALKER: Gluconeogenesis in the newborn rat: the substrates and their quantitative significance. Enzyme 15 (1973), 40-81

29. FELIG, P., and J. WAHREN: Protein turnover and amino acid metabolism in the regulation of gluconeogenesis. Fed. Proc. 33 (1974), 1092-1097

30. MILEWSKI, P., R. DÖLP, W. DICK und F.W. AHNEFELD: Fasten und operative Eingriffe. Infusionstherapie 4 (1977), 20-25

31. RUDERMAN, N.B.: Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. Annu. Rev. Med. 26 (1975), 245-258

32. RUDERMAN, N.B., T.T. AOKI, and G.F. CAHILL, jr.: Gluconeogenesis and its disorders in man. In "Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species"; ed. by R.W. HANSON and M.A. MEHLMAN. John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto (1976), 515-532

33. CAHILL,G.F. jr., M.G. HERRERA, A.P. MORGAN, J.S. SOELDNER, J. STEINKE, P.L. LEVY, G.A. REICHARD jr., and D.M. KIPNIS: Hormone-fuel interrelationships during fasting. J. Clin.Invest. 45 (1966), 1751-1769

34. CAHILL, G.F.jr.: Starvation in Man. New Engl. J.Med. 282 (197o), 668-675

35. DITSCHUNEIT,H., J.D. FAULHABER, I. BEIL, and E.F. PFEIFFER: Veränderungen des Stoffwechsels bei Null-Diät. Internist 11 (197o), 176-183

36. DIETZE,G., M. WICKLMAYR und H. MEHNERT: Physiologie des Hungerstoffwechsels. Klinische Anästhesiologie und Intensivtherapie, 7 (1975), 2o-34. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

37. WAHREN,J., P. FELIG, L. HAGENFELDT, R. HENDLER,and G. AHLBORG: Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids and amino acids during prolonged exercise in man. In "Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise"; ed. by H. HOWALD and J.R. POORTMANS. Birkhäuser Verlag, Basel (1975), 144-153

38. FELIG,P.: The liver in glucose homeostasis in normal man and in diabetes. In "Diabetes-Its Physiological and Biochemical Basis"; ed. by J. VALLANCE-OWEN. MTP Press, Lancaster (1975), 93-123

39. EXTON,J.H.: Gluconeogenesis, Metabolism 21 (1972), 945-99o

40. EXTON,J.H., L.E. MALLETTE, L.S. JEFFERSON, E.H.A. WONG, N. FRIEDMANN, T.B. MILLER jr., and C.R. PARK: The hormonal control of hepatic gluconeogenesis. Recent Prog. Horm. Res. 26 (1970), 411-461

41. UNGER, R.H.: Insulin/glucagon ratio. In "Impact of Insulin on Metabolic Pathways"; ed. by E. SHAFRIR. Academic Press, New York, London (1972), 78-83

42. EXTON, J.H., and C.R. PARK: Interaction of insulin and glucagon in the control of liver metabolism. In "Handbook of Physiology-Endocrinology I: Endocrine Pancreas"; ed. by D.F. STEINER and F. FREINKEL. American Physiological Society, Washington, D.C. (1972), 437-455

43. PARRILLA, R., M.N. GOODMAN, and C.J. TOEWS:
Effect of glucagon: insulin ratios on hepatic metabolism.
Diabetes 23 (1974), 725-731

44. SEITZ, H.J., M.J. MÜLLER, P. NORDMEYER, W. KRONE, and W. TARNOWSKI:
Concentration of cyclic AMP in rat liver as a function of the insulin/glucagon ratio in blood under standardized physiological conditions.
Endocrinology 99 (1976), 1313-1318

45. SEITZ, H.J.: Schnelle und koordinierte Umsteuerung des Intermediär-Stoffwechsels der Leber von Glucose-Produktion zu Glucose-Utilisation durch Änderung des Insulin/Glukagon-Quotienten im Blut.
Habilitationsschrift, Hamburg (1977)

46. THIENHAUS, R., L. THARANDT, U. ZAIS und W. STAIB:
Einfluß vom Glucocorticoiden auf die Freisetzung von Aminosäuren des perfundierten Hinterkörpers adrenalektomierter Ratten.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 356 (1975), 811-817

47. RUDERMAN, N.B., and M. BERGER:
The formation of glutamine and alanine in skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 249 (1974), 5500-5506

48. KOMINZ, D.R., A. HOUGH, P. SYMONDS, and K. LAKI:
The amino acid composition of actin, myosin, tropomyosin and the meromyosins.
Arch. Biochem. Biophys. 50 (1954), 148-159

49. EBASHI, S., and Y. NONOMURA:
Proteins of the myofibril.
In "The Structure and Function of Muscle III: Physiology and Biochemistry"; ed. by G.H. BOURNE.
Academic Press, New York, London (1973), 285-362

50. BAÑOS, G., P.M. DANIEL, S.R. MOORHOUSE, and O.E. PRATT:
The movement of amino acids between blood and skeletal muscle in the rat.
J. Physiol. 235 (1973), 459-475

51. ADIBI, S.A.:
Interrelationships between level of amino acids in plasma and tissues during starvation.
Am.J.Physiol. 221 (1971), 829-838

52. KARL, I.E., A.J. GARBER, and D.M. KIPNIS:
Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle.
III. Dietary and hormonal regulation.
J.Biol.Chem. 251 (1976), 844-850

53. ISHIKAWA, E., T. AIKAWA, and H. MATSUTAKA:
The role of alanine and serine in hepatic gluconeogenesis.
J.Biochem. 71 (1972), 1093-1095

54. ISHIKAWA, E., T. AIKAWA, and H. MATSUTAKA:
The roles of alanine as a major precursor among amino acids for hepatic gluconeogenesis and as a major end product of the degradation of amino acids in rat tissues.
J.Biochem. 71 (1972), 1097-1099

55. MALLETTE, L.E., J.H. EXTON, and C.R. PARK:
Effects of glucagon on amino acid transport and utilization in the perfused rat liver.
J.Biol.Chem. 244 (1969), 5724-5728

56. MÜLLER, W.A., G.R. FALOONA, and R.H. UNGER:
The effect of alanine on glucagon secretion.
J. Clin.Invest. 50 (1971), 2215-2218

57. WISE, J.K., R. HENDLER, and P. FELIG:
Obesity: evidence of decreased secretion of glucagon.
Science 178 (1972), 513-514

58. WISE, J.K., R. HENDLER, and P. FELIG:
Evaluation of alpha-cell function by infusion of alanine in normal, diabetic and obese subjects.
New Engl. J.Med. 288 (1973), 487-490

59. FRIEDRICHS, D., and W. SCHONER:
Regulation of gluconeogenesis by alanine.
Biochim. Biophys. Acta 343 (1974), 341-355

60. WEBER, G.:
Regulation of pyruvate kinase.
Adv. Enzyme Regul. 7 (1969), 15-40

61. WALTER, P., F. NYFELER und U. Moser:
Regulation der Glycogensynthese durch C-3-Verbindungen in isolierten Leberzellen von gefasteten Ratten.
Vortrag auf einer Arbeitstagung der Gruppe "Nahrungsbedingte Regulation des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels" im Schwerpunkt "Ernährungsforschung" der DFG.
Reinhausen/Göttingen (1976), Abstract

62. ISHIKAWA, E.:
The regulation of uptake and output of amino acids by rat tissues.
Adv. Enzyme Regul. 14 (1976), 117-136

63. POZEFSKY, T., P. FELIG, J.D. TOBIN, J.S. SOELDNER, and G.F. CAHILL jr.:
Amino acid balance across tissues of the forearm in postabsorptive man. Effects of insulin at two dose levels.
J.Clin.Invest. 48 (1969), 2273-2282

64. FELIG, P., T. POZEFSKY, E. MARLISS, and G.F. CAHILL jr.:
Alanine: key role in gluconeogenesis.
Science 167 (1970), 1003-1004

65. CORI, C.F., and G.T. CORI:
Glycogen formation in the liver from d- and l-lactic acid.
J.Biol.Chem. 81 (1929), 389-403

66. CORI, C.F.:
Mammalian carbohydrate metabolism.
Physiol Rev. 11 (1931), 143-275

67. MALLETTE, L.E., J.H. EXTON, and C.R. PARK:
Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver.
J. Biol. Chem. 244 (1969), 5713-5723

68. FELIG, P.:
The glucose-alanine cycle.
Metabolism 22 (1973), 179-207

69. FELIG, P.:
Amino acid metabolism in man.
Annu. Rev. Biochem. 44 (1975), 933-955

70. RUDORFF, K.H., G. ALBRECHT, and W. STAIB:
Effect of insulin and proinsulin on the metabolism of alanine in the rat liver.
Horm.Metab.Res. 2 (1970), 49-50

71. RUDORFF, K.H., H. HUCHZERMEYER, R. WINDECK und W. STAIB:
Über den Einfluß von Insulin auf die Alaningluconeogenese in der isoliert perfundierten Leber von New Zealand Obese Mice.
Eur.J.Biochem. 16 (1970), 481-486

72. RUDORFF, K.H., H. KRÖNER, R. WINDECK und W. STAIB:
Über den Einfluß von Insulin und Betamethason auf die Gluconeogenese aus Alanin und Pyruvat in der isoliert perfundierten Leber adrenalektomierter Ratten.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 351 (1970), 1064-1070

73. FELIG, P., and J. WAHREN:
Influence of endogenous insulin secretion on splanchnic glucose and amino acid metabolism in man.
J.Clin.Invest. 50 (1971), 1702-1711

74. EXTON, J.H., N. FRIEDMANN, E. HEE-AIK WONG, J.P.BRINEAUX, J.D. CORBIN, and C.R. PARK:
Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue.
J.Biol.Chem. 247 (1972) 3579-3588

75. WISE, J.K., R. HENDLER, and P. FELIG:
Influence of glucocorticoids on glucagon secretion and plasma amino acid concentrations in man.
J.Clin.Invest. 52 (1973), 2774-2782

76. EISENSTEIN, A.B., S. SPENCER, S. FLATNESS, and A. BRODSKY:
Carbohydrate synthesis in the isolated perfused rat liver: role of the adrenal cortex.
Endocrinology 79 (1966), 182-186

77. RUDERMAN, N.B., and P. LUND:
Amino acid metabolism in skeletal muscle: regulation of glutamine and alanine release in the perfused rat hindquarter.
Isr. J.Med. Sci. 8 (1972), 295-302

78. ODESSEY R., E.A. KHAIRALLAH, and A.L. GOLDBERG:
Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 249 (1974), 7623-7629

79. GARBER, A.J., I.E. KARL, and D.M. KIPNIS:
Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. I.Glycolysis and amino acid release.
J.Biol.Chem. 251 (1976), 826-835

80. GARBER, A.J., I.E. KARL, and D.M. KIPNIS:
Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. II. The precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis.
J.Biol.Chem. 251 (1976), 836-843

81. GRUBB, B.:
De novo synthesis of alanine by the perfused rat hindlimb.
Am.J.Physiol. 230 (1976), 1379-1384

82. SNELL, K.:
Alanine release by rat hemidiaphragm muscle in vitro.
Biochem.Soc.Transactions 4 (1976), 287-288

83. GOLDSTEIN, L., and E.A. NEWSHOLME:
The formation of alanine from amino acids in diaphragm muscle of the rat.
Biochem.J. 154 (1976), 555-558

84. UNGER, R.H.:
Pancreatic glucagon in health and disease.
Adv.Intern.Med. 17 (1971), 265-288

85. ZUKOSKI, C.F.:
Mechanism of action of insulin hypoglycemia on adrenal cortical secretion.
Endocrinology 78 (1966), 1264-1267

86. YOUNG, V.R., and N.S. SCRIMSHAW:
The physiology of starvation.
Sci.Am. 225 (Oct.) (1971), 14-21

87. OWEN, O.E., A.P. MORGAN, H.G. KEMP, J.M. SULLIVAN, M.G. HERRERA, and G.F. CAHILL jr.:
Brain metabolism during fasting.
J.Clin.Invest. 46 (1967), 1589-1595

88. SHERWIN, R.S., R.G. HENDLER, and P. FELIG:
Effect of ketone infusions on amino acid and nitrogen metabolism in man.
J.Clin.Invest. 55 (1975), 1382-1390

89. BERGER, M., F.W. KEMMER, M.N. GOODMAN, H. ZIMMERMANN-TELSCHOW, and N.B. RUDERMAN:
Ketone body metabolism in isolated perfused muscle.
In "Biochemical and Clinical Aspects of Ketone Body Metabolism"; ed. by H.D. Söling and C.D. Seufert.
Georg Thieme Publishers, Stuttgart (1978), 193-203

90. Mc GARRY, J.D., J.M. MEIER, and D.W. FOSTER:
The effects of starvation and refeeding on carbohydrate and lipid metabolism in vivo and in the perfused rat liver.
J.Biol.Chem. 248 (1973), 270-278

91. GANONG, W.F.:
Medizinische Physiologie.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1972), S. 329

92. DESAULLES, P.A. and W. RITTEL :
Adrenocorticotrophic activity of synthetic peptide sequences related to ACTH.
In "The Investigation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function"; ed. by V.H.T. JAMES and J.LANDON.
Cambridge at the University Press (1968), 127.

93. NEUMANN, F. und B. SCHENK:
Endokrinpharmakologie -Pharmakotherapie mit Hormonen.
In "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie"; hrsg. von W.FORTH, D. HENSCHLER und W. RUMMEL.
Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich (1975), 304-352

94. HOLLMANN, W. und H. LIESEN:
Beurteilung und Größe der körperlichen Leistungsfähigkeit.
In "Leistungsmedizin - Sportmedizin für Klinik und Praxis"; hrsg. von K.D. HÜLLEMANN.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1976), 10-37

95. RUDERMAN, N.B., C.R.S. HOUGHTON, and R.HEMS:
Evaluation of the isolated perfused rat hindquarter for the study of muscle metabolism.
Biochem. J. 124 (1971), 639-651

96. BERGER, M.:
Untersuchungen zur Regulation des Glukosestoffwechsels der Skelettmuskulatur.
Habilitationsschrift, Düsseldorf (1975)

97. JEFFERSON, L.S.:
A technique for perfusion of an isolated preparation of rat hemicorpus.
Methods Enzymol. 39 (1975), 73-82

98. ROSS, B.D.: "Perfusion Techniques in Biochemistry".
5. Heart and skeletal muscle.
Clarendon Press, Oxford (1972), 258-320

99. JEFFERSON, L.S., J.B.LI, and S.R. RANNELS :
Regulation by insulin of amino acid release and protein turnover in the perfused rat hemicorpus.
J.Biol.Chem. 252 (1977), 1476-1483

100. LI, J.B., and L.S. JEFFERSON:
Effect of isoproterenol on amino acid levels and protein turnover in skeletal muscle.
Am. J. Physiol. 232 (1977), E 243 - E 249

101. ARIANO, M. A., R.B. ARMSTRONG, and V.R. EDGERTON:
Hindlimb muscle fiber populations of five mammals.
J.Histochem. Cytochem. 21 (1973), 51-55

102. BALDWIN, K.M., G.H. KLINKERFUSS, R.L. TERJUNG, P.A. MOLÉ, and J.O. HOLLOSZY:
Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: adaptative response to exercise.
Am.J.Physiol. 222 (1972), 373-378

103. BALDWIN, K.M., W.W. WINDER, R.L. TERJUNG, and J.O. HOLLOSZY:
Glycolytic enzymes in different types of skeletal muscle: adaptation to exercise.
Am.J. Physiol . 225 (1973), 962-966

104. CHAPLER, C.K., and W.N. STAINSBY:
Carbohydrate metabolism in contracting dog skeletal muscle in situ.
Am.J. Physiol. 215 (1968), 995-1004

105. SKINNER, N.S.jr., J.C. COSTIN, B. SALTIN, and G. VASTAGH:
Glucose uptake in contracting, isolated in situ dog skeletal muscle.
In "Muscle Metabolism During Exercise"; ed. by B. PERNOW and B.SALTIN.
Plenum Press, New York, London (1971), pp. 177-187

106. HIRCHE, H.J., W.K. RAFF, and D. GRÜN:
The resistance to blood flow in the gastrocnemius of the dog during sustained and rhythmical isometric and isotonic contractions.
Pflügers Arch. 314 (1970), 97-112

107. HIRCHE, H., U. WACKER, and H.D. LANGOHR:
Lactic acid formation in the working gastrocnemius of the dog.
Int. Z. Angew. Physiol. 30 (1971), 52-64

108. GOLDBERG, A.L., S.B. MARTEL, and M.J. KUSHMERICK:
In vitro preparations of the diaphragm and other skeletal muscles.
Methods Enzymol. 39 (1975), 82-94

109. DOCUMENTA GEIGY:
Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage (Nachdruck 1969)
J.R. Geigy AG, Basel (1968) SS. 383,516

110. RAUEN, H.M. Hrsg.:
Biochemisches Taschenbuch - Zweiter Teil; 2. Auflage.
Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York (1964), SS. 332, 340, 341, 412.

111. KRATZING, C.C.:
Metabolic rates for slices of animal tissues. In "Biochemists' Handbook"; ed. by C. LONG.
E.&F.N. Spon Ltd., London (1961), 795-810

112. ALTMAN, P.L.,and D.S. DITTMER, eds.:
Biological Handbooks - Metabolism.
70. Oxygen consumption: animal tissues.
Fed.Am.Soc.Exp.Biol., Bethesda, Maryland (1968), 385-397

113. THIENHAUS, R.:
unveröffentlichter Befund im Rahmen der unter (46) zitierten Untersuchungen (1973)

114. GERBER, G.B.:
An efficient oxygenator for organ perfusion.
J.Appl.Physiol. 20 (1965), 159-160

115. SCHIMASSEK, H.:
Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber.
Biochem.Z. 336 (1963), 460-467

116. SCHIMASSEK,H.:
Möglichkeiten und Grenzen der Methodik. In "Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber"; hrsg. von W. STAIB und R. SCHOLZ.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1968), 1-10.

117. MEIERS, H.G., J. FLAMMANN, G. ALBAUM und W. STAIB :
Zur Methode der Perfusion isolierter Rattenlebern.
Biochem.Z. 344 (1966), 514-523

118. SCHWENEN, M.:
Glykoneogenese aus extrahepatischen Substraten - Cortisolwirkungen auf den Stoffwechsel der isoliert perfundierten Rattenleber.
Anhang: Die Perfusionstechnik der isolierten Rattenleber.
Med. Dissertation, Düsseldorf (1970)

119. COHEN, P.P.:
Suspending media for animal tissues. In "Manometric Techniques"; ed. by W.W. UMBREIT, R.H. BURRIS, and J.F. STAUFFER.
Burgess Publishing Co., Minneapolis (1957), 147-150

120. CONLEY, C.L.:
The blood. In "Medical Physiology - Vol.II";
ed. by V.B. MOUNTCASTLE.
C.V.Mosby Co., Saint Louis (1974), 1027-1037

121. RAPOPORT, S.M.:
"Medizinische Biochemie". Das Blut: 4. Die Erythrocyten.
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1975),619-631

122. VALTIS, D.J., and A.D. KENNEDY:
Defective gas-transport function of stored red blood-cells.
Lancet 1 (1954), 119-125

123. HUEHNS, E.R.:
Disorders of carbohydrate metabolism inthe red blood corpuscle.
Clin.Endocrinol.Metabol. 5 (1976), 651-674

124. WOLLENBERGER, A., O. RISTAU und G. SCHOFFA:
Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke.
Pflügers Arch. 270 (1960), 399-412

125. ROSS, G., F.N. WHITE, A.W. BROWN,and A. KOLIN:
Regional blood flow in the rat.
J.Appl.Physiol. 21 (1966), 1273-1275

126. BERGER, M., S. HAGG,and N.B. RUDERMAN:
Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Interaction of insulin and exercise on glucose uptake.
Biochem.J. 146 (1975), 231-238

127. RUDERMAN, N.B., and M.G. HERRERA:
Glucose regulation of hepatic gluconeogenesis.
Am.J.Physiol. 214 (1968), 1346-1351

128. ROSS, B.D.:
"Perfusion Techniques in Biochemistry"; Tests of liver function applicable to the perfused organ.
Clarendon Press, Oxford (1972), 189-193

129. PETRIDES, P.E. und G. LÖFFLER:
Muskelgewebe - Stoffwechsel der Muskulatur: Bedeutung des Kreatinphosphats, S. 802. In " Physiologische Chemie"; hrsg. von H.A.HARPER, G. LÖFFLER, P.E. PETRIDES und L. WEISS.
Springer-Verlag, Berlin,Heidelberg, New York (1975)

130. WERNER, W., H.G. REY und H. WIELINGER:
Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutglucosebestimmung nach der GOD/POD - Methode.
Z.analyt.Chem. 252 (1970), 224

131. BERGMEYER, H.U. und E. BERNT:
D-Glucose - Bestimmung mit Glucose-Oxydase und Peroxydase. Verfahren mit 2,2' -Azino-di-(3-äthylbenzthiazolin) -6 - sulfonat (ABTS). In " Methoden der enzymatischen Analyse" - Band II, 3. Auflage; hrsg. von H.U. BERGMEYER.Verlag Chemie, Weinheim (1974), SS. 1257-1259

132. BOEHRINGER MANNHEIM DIAGNOSTICA:
Test-Fibel. Ausgabe 1975.
Mannheim (1975)

133. HOHORST, H.J.:
L-(+) - Lactat - Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. In " Methoden der enzymatischen Analyse"-
Band II, 2. Auflage; hrsg. von H.U. BERGMEYER.
Verlag Chemie, Weinheim (1970), SS. 1425-1429

134. CZOK, R. und W. LAMPRECHT:
Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-phosphat.
IN " Methoden der enzymatischen Analyse" -Band II, 3. Auflage;
hrsg. von H.U. BERGMEYER.
Verlag Chemie, Weinheim (1974), SS. 1491-1496

135. WILLIAMSON, D.H.:
L-Alanin - Bestimmung mit Alanin-Dehydrogenase.
In " Methoden der enzymatischen Analyse " - Band II,
3. Auflage; hrsg. von H.U. BERGMEYER.
Verlag Chemie, Weinheim (1974), SS.1724-1727

136. EGGSTEIN, M. und E. KUHLMANN:
Triglyceride und Glycerin (alkalische Verseifung). In
"Methoden der enzymatischen Analyse" - Band II, 3. Auflage;
hrsg. von H.U. BERGMEYER.
Verlag Chemie, Weinheim (1974), SS.1871-1878

137. DUNCOMBE, W.G.:
The colorimetric micro - determination of non - esterified
fatty acids in plasma.
Clin.Chim.Acta 9 (1964), 122-125

138. RICHTERICH, R.:
Klinische Chemie - Theorie und Praxis; 3. Auflage.
S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney
(1971), SS 145-148, 218-222

139. Handbuch: Flammenphotometer EPPENDORF.
Eppendorf Gerätebau Netheler + Hinz, Hamburg

140. VAN KAMPEN, E.J., and W.G. ZIJLSTRA:
Standardization of hemoglobinometry.
II. The hemiglobincyanide method.
Clin.Chim.Acta 6 (1961), 538-544

141. FAWCETT, J.K., and J.E. SCOTT:
A rapid and precise method for the determination of urea.
J.Clin.Path. 13 (1960), 156-159

142. GUTMANN, I. und H.U. BERGMEYER:
Harnstoff - Bestimmung von Harnstoff, Indikatorreaktion mit
Phenol und Hypochlorit.
In " Methoden der enzymatischen Analyse"
- Band II, 3. Auflage; Hrsg. von H.U. BERGMEYER.
Verlag Chemie, Weinheim (1974), SS. 1839-1842

143. MÜTING, D. und E. KAISER:
Zur quantitativen Bestimmung von α-Amino-Stickstoff in biologischem Material mittels der Ninhydrin-Reaktion.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 332 (1963), 276-281

144. LAMPRECHT, W., P. STEIN, F. HEINZ und H. WEISSER:
Creatinphosphat-Bestimmung mit Creatin-Kinase, Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In "Methoden der enzymatischen Analyse" - Band II, 3. Auflage; hrsg. von H.U. BERGMEYER.
Verlag Chemie, Weinheim (1974), SS. 1825-1829

145. JAWOREK, D., W. GRUBER und H.U. BERGMEYER:
Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat.
In "Methoden der enzymatischen Analyse" -Band II, 3. Auflage; hrsg. von H.U. BERGMEYER,
Verlag Chemie, Weinheim (1974), SS. 2178-2181

146. SEIFTER, S., S. DAYTON, B. NOVIC, and E. MUNTWYLER:
The estimation of glycogen with the anthrone reagent.
Arch. Biochem. 25 (1950), 191-200

147. GOOD, C.A., H. KRAMER, and M. SOMOGYI:
The determination of glycogen.
J. Biol. Chem. 100 (1933), 485-491

148. CLERBAUX, T., G. GERETS, and A. FRANS:
Oxygen content determination using a new analyzer: the Lex-O_2-Con.
J. Lab. Clin. Med. 82 (1973), 342-348

149. JEFFAY, H., and J. ALVAREZ:
Liquid scintillation counting of carbon-14: Use of ethanolamine-ethylene glycol monomethyl ether- toluene.
Anal. Chem. 33 (1961), 612-615

150. ARONOFF, S.:
"Techniques of Radiobiochemistry"; 5. Nachdruck. 9. Amino acids.
The Iowa State University Press, Ames, Iowa (1961), 172

151. HERBERG, R.J.:
Determination of carbon-14 and tritium in blood and other whole tissues. Liquid scintillation counting of tissues.
Anal. Chem. 32 (1960), 42-46

152. RAY, P.D., D.O. FOSTER, and H.A. LARDY:
Mode of action of glucocorticoids. I. Stimulation of gluconeogenesis independent of synthesis de novo of enzymes.
J. Biol. Chem. 239 (1964), 3396-3400

153. SCHONER, W., U. HAAG, and W. SEUBERT:
On the mechanism of gluconeogenesis and its regulation.
VI. Regulation of carbohydrate metabolism by cortisol independent of the de novo synthesis of enzymes in rat liver.
Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 351 (1970), 1071-1088

154. "STUDENT" (W.S. GOSSET):
Errors of routine analysis.
Biometrika 19 (1927), 151-164

155. CAMPBELL, R.C.:
"Statistische Methoden für Biologie und Medizin".
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971)

156. DOCUMENTA GEIGY:
Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage (1. Nachdruck 1969).
Signifikanzschranken der Student-Verteilung (Rubrik:2P), S. 32
J.R. Geigy AG, Basel (1968)

157. MALAISSE, W., F. MALAISSE-LAGAE, and P.H. WRIGHT:
A new method for the measurement in vitro of pancreatic insulin-secretion.
Endocrinology 80 (1967), 99-108

158. LI, J.B., and A.L. GOLDBERG:
Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles.
Am. J. Physiol. 231 (1976), 441-448

159. MILLWARD, D.J.:
Protein turnover in skeletal muscle. II. The effect of starvation and a protein-free diet on the synthesis and catabolism of skeletal muscle proteins in comparison to liver.
Clin. Sci. 39 (1970), 591-603

160. MILLWARD, D.J., and P.J. GARLICK:
The pattern of protein turnover in the whole animal and the effect of dietary variations.
Proc. Nutr. Soc. 31 (1972), 257-263

161. MILLWARD, D.J., P.J. GARLICK, W.P.T. JAMES, D.O. NNANYELUGO, and J.S. RYATT:
Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle.
Nature 241 (1973), 204-205

162. MILLWARD, D.J., D.O. NNANYELUGO, W.P.T. JAMES, and P.J. GARLICK:
Protein metabolism in skeletal muscle, the effect of feeding and fasting on muscle RNA, free amino acids and plasma insulin concentrations.
Br. J. Nutr. 32 (1974), 127-142

163. ADIBI, S.A., E.L. MORSE, and I.A. MIRSKY:
Dietary regulation of liver and muscle transport of amino acid,
Am. J. Physiol. 230 (1976), 245-250

164. FELIG, P., O.E. OWEN, J. WAHREN, and G.F. CAHILL jr.:
Amino acid metabolism during prolonged starvation.
J. Clin. Invest. 48 (1969), 584-594

165. ADIBI, S.A., and A.L. DRASH:
Hormone and amino acid levels in altered nutritional states.
J. Lab. Clin. Med. 76 (1970), 722-732

166. MANCHESTER, K.L.:
Oxidation of amino acids by isolated rat diaphragm and influence of insulin.
Biochim. Biophys. Acta 100 (1965), 295-298

167. ODESSEY, R., and A.L. GOLDBERG:
Oxidation of leucin by rat skeletal muscle.
Am.J.Physiol. 223 (1972), 1376-1383

168. GOLDBERG, A.L., and R. ODESSEY:
Oxidation of amino acids by diaphragms from fed and fasted rats.
Am.J.Physiol. 223 (1972), 1384-1391

169. BUSE, M.G., J.F. BIGGERS, K.H. FRIDERICI, and J.F. BUSE:
Oxidation of branched chain amino acids by isolated hearts and diaphragms of the rat. The effect of fatty acids, glucose, and pyruvate respiration.
J.Biol.Chem. 247 (1972), 8085-8096

170. BUSE, M.G., J.F. BIGGERS, C. DRIER, and J.F. BUSE:
The effect of epinephrine, glucagon, and the nutritional state on the oxidation of branched chain amino acids and pyruvate by isolated hearts and diagphragms of the rat.
J.Biol.Chem. 248 (1973), 697-706

171. BEATTY, C.H., S.CURTIS, M.K.YOUNG, and R.M. BOCEK:
Oxidation of amino acids by red and white muscle fiber groups.
Am.J.Physiol. 227 (1974), 268-272

172. ADIBI, S.A.:
Metabolism of branched - chain amino acids in altered nutrition.
Metabolism 25 (1976), 1287-1302

173. BLACKSHEAR, P.J., P.A.H. HOLLOWAY, and K.G.M.M. ALBERTI:
The metabolic effects of sodium dichloroacetate in the starved rats.
Biochem.J. 142 (1974), 279-286

174. Mac DONALD, M., N. NEUFELDT, B.N. PARK, M. BERGER, and N. RUDERMAN:
Alanine metabolism and gluconeogenesis in the rat.
Am.J.Physiol. 231 (1976), 619-626

175. RUDERMAN, N.B., F.W. SCHMAHL, and M.N. GOODMAN:
Regulation of alanine formation and release in rat muscle in vivo: effect of starvation and diabetes.
Am.J.Physiol. 233 (1977), E 109- E 114

176. SEITZ, H.J., M.J. MÜLLER, W. KRONE, and W. TARNOWSKI:
Coordinate control of intermediary metabolism in rat liver by the insulin/glucagon ratio during starvation and after glucose refeeding. Regulatory significance of long - chain acyl - CoA and cyclic AMP.
Arch.Biochem.Biophys. 183 (1977), 647-663

177. Von HOLT, C., H. SCHMIDT, H. FELDMANN und I. HALLMANN:
Der Umsatz der Blutglucose.
Biochem.Z. 334 (1961), 524-533

178. Von HOLT, C., H. SCHMIDT und H. FELDMANN:
Der Anteil der Glucoseoxydation an der Kohlendioxydproduktion der Ratte.
Biochem.Z. 334 (1961), 545-559

179. FELIG, P., and J. WAHREN:
Interrelationship between amino acid and carbohydrate metabolism during exercise: the glucose alanine - cycle.
In "Muscle Metabolism During Exercise"; ed. by B. PERNOW and B. SALTIN.
Plenum Press, New York, London (1971), 205-214

180. CLAUSEN, T.:
The effect of insulin on glucose transport in muscle cells.
In "Current Topics in Membranes and Transport - Vol. VI"; ed. by F. BRONNER and A. KLEINZELLER.
Academic Press, San Francisco (1975), pp. 169-226

181. DANIEL, P.M., E.R. LOVE, and O.E. PRATT:
The effect of insulin upon the movement of glucose into the skeletal muscle of the rat in vivo.
J.Physiol. 239 (1974), 90 P - 91 P

182. MORGAN, H.E., and J.R. NEELY:
Insulin and membrane transport. In " Handbook of Physiology, Sect.7, Endocrinology I: Endocrine Pancreas"; ed. by D.F. STEINER and N. FREINKEL .
American Physiological Society, Washington, D.C.(1972), pp.323-331

183. WIELAND, O., E. SIESS, F.H. SCHULZE - WETHMAR, H.J.v. FUNCKE und C. PATZELT:
Pyruvatstoffwechsel und Insulinmangel. In "Biochemie und Klinik des Insulinmangels"; hrsg. von O. WIELAND und H. MEHNERT.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971), SS. 72-83

184. RANDLE, P.J.:
Diabetes and the metabolism of pyruvate.
In "Diabetes Research Today"; Symposia Medica Hoechst, 12.
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York (1976), pp. 97-115

185. BERGER, M., S.A. HAGG, M.N. GOODMAN, and N.B. RUDERMAN:
Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Effects of starvation, diabetes, fatty acids, acetoacetate, insulin and exercise on glucose uptake and disposition.
Biochem.J.158 (1976), 191-202

186. RUDERMAN, N.B., M.N.GOODMAN, M. BERGER, and S. HAGG:
Effect of starvation on muscle glucose metabolism: studies with the isolated perfused rat hindquarter.
Fed.Proc. 36 (1977), 171-176

187. HENNIG, G., G. LÖFFLER, and O.H. WIELAND:
Active and inactive forms of pyruvatedehydrogenase in skeletal muscle as related to the metabolic and functional state of the muscle cell.
FEBS Letters 59 (1975), 142-145

188. HAGG, S.A., S.I. TAYLOR, and N.B. RUDERMAN:
Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Pyruvate dehydrogenase activity in starvation, diabetes and exercise.
Biochem. J. 158 (1976), 203-210

189. WOOL, I.G.:
Effects of insulin on cellular protein synthesis.
In "Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXXII/2- Insulin, Part 2"; ed. by A. HASSELBLATT and F.v. BRUCHHAUSEN.
Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1975), pp. 267-302

190. JEFFERSON, L.S., D.E. RANNELS, B.L. MUNGER, and H.E. MORGAN:
Insulin in the regulation of protein turnover in heart and skeletal muscle.
Fed.Proc. 33 (1974), 1098 - 1104

191. RÖTHIG, H.J., N. STILLER, and H. REINAUER:
Proteolytic activities in skeletal muscle of diabetic rats.
Diabetologia 11 (1975), 373

192. MAYER, M., R. AMIN, and E. SHAFRIR:
Rat myofibrillar protease: enzyme properties and adaptive changes in conditions of muscle protein degradation.
Arch.Biochem.Biophys. 161 (1974), 20-25

193. CHOWERS, I., R. EINAT, and S. FELDMAN:
Effects of starvation on levels of corticotrophin releasing factor, corticotrophin and plasma corticosterone in rats.
Acta Endocrinol. 61 (1969), 687-694

194. COHN, C., E. SHRAGO, and D. JOSEPH:
Effect of food administration on weight gains and body composition of normal and adrenalectomized rats.
Am.J.Physiol. 180 (1955), 503-507

195. KRONE, W., W.B. HUTTNER, H.J. SEITZ, and W. TARNOWSKI:
Effect of cold exposure on phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) activity and cyclic AMP concentration in livers of starved rats. Role of glucocorticoids.
Biochim.Biophys.Acta 444 (1976), 694-703

196. HOFMANN, F.G.:
Role of the adrenal cortex in homeostasis and growth.
In "The Human Adrenal Cortex"; ed. by N.P. CHRISTY.
Harper & Row Publishers, New York, Evanston, San Francisco, London (1971), 303-316

197. INGLE, D.J.:
The role of the adrenal cortex in homeostasis.
J.Endrocinol. 8 (1952), XXIII - XXXVII

198. BONDY, P.K.:
The effect of the adrenal and thyroid glands upon the rise of plasma amino acids in the eviscerated rat.
Endocrinology 45 (1949), 605-608

199. INGLE, D.J., M.C. PRESTRUD, and J.E. NEZAMIS:
Effect of cortisone acetate upon plasma amino acids in the eviscerate rat.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 75 (1950), 801-803

200. FRIEDBERG, F., and D.M. GREENBERG:
Endocrine regulation of amino acid levels in blood and tissues.
J.Biol.Chem. 168 (1947), 405-409

201. CLARK, I.:
The effect of cortisone upon protein synthesis.
J.Biol.Chem. 200 (1953), 69-76

202. SMITH, O.K., and C.N.H. LONG:
Effect of cortisol on the plasma amino nitrogen of eviscerated adrenalectomized - diabetic rats.
Endocrinology 80 (1967), 561-566

203. MEIERS, H.G., K.H. RUDORFF, G. ALBAUM und W. STAIB:
Wirkungen von Cortisol an der isoliert perfundierten Rattenleber.
Hoppe - Seyler's Z.Physiol.Chem. 348 (1967), 944-946

204. STAIB, W., R. STAIB, J. HERRMANN, H.G. MEIERS, H. SCHLÄGER, M. SCHWENEN, K.H. RUDORFF und P. LUX:
Untersuchungen über die Cortisolglykoneogenese in der isoliert perfundierten Rattenleber.
In "Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber"; hrsg. von W. STAIB und R. SCHOLZ.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1968), 155-165

205. HAFT, D.E., E. TENNEN, and S. MEHTALIA:
Alanine metabolism in perfused livers of normal and adrenalectomized rats.
Am.J.Physiol. 222 (1972), 365-372

206. SEITZ, H.J., M. KAISER, W. KRONE, and W. TARNOWSKI:
Physiologic significance of glucocorticoids and insulin in the regulation of hepatic gluconeogenesis during starvation in rats.
Metabolism 25 (1976), 1545-1555

207. DUNN, A., M. CHENOWETH, and L.D. SCHAEFFER:
Effect of adrenalectomy on glucose turnover, the Cori cycle, and gluconeogenesis from alanine.
Biochim.Biophys.Acta 177 (1969), 11-16

208. EXTON, J.H., and S.C. HARPER:
Role of cyclic AMP and glucocorticoids in the activation of hepatic gluconeogenesis by diabetes.
Fed.Proc. 31 (1972), 243 Abs

209. LARDY, H.A., D.O. FOSTER, E. SHRAGO, and P.D. RAY:
Metabolic and hormonal regulation of phosphopyruvate synthesis.
Adv.Enzyme Regul. 2 (1964), 39-47

210. KRONE, W., W. MARQUARDT, H.J. SEITZ, and W. TARNOWSKI:
Interaction between glucocorticoids and cyclic AMP in the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the isolated perfused rat liver. Effects of cordycepin and cycloheximide.
Biochim.Biophys.Acta 451 (1976), 72-81

211. TILGHMAN, S.M., R.W. HANSON, and F.J. BALLARD:
Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in mammalian tissues. In "Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species"; ed.by R.W. HANSON and M.A. MEHLMAN.
John Wiley & Sons, New York,London,Sydney,Toronto (1976), 47-91

212. EXTON, J.H., S.C. HARPER, A.L. TUCKER, J.L. FLAGG, and C.R. PARK:
Effects of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on gluconeogenesis in perfused livers from diabetic rats.
Biochim. Biophys. Acta 329 (1973), 41-57

213. EXTON, J.H., T.B. MILLER jr., S.C. HARPER, and C.R. PARK:
Carbohydrate metabolism in perfused livers of adrenalectomized and steroid replaced rats.
Am. J. Physiol. 230 (1976), 163-170

214. EHRENTHEIL, O.F., L.J. REYNA, C.J. ADAMS, T.J. GIOVANNIELLO, and E.T. CHEN:
Blood sugar response to electric shock stress in normal, adrenalectomized and hypophysectomized white rats.
Diabetes 16 (1967), 325-330

215. MEIERS, H.G., W. BEIEN, T. DIETERICH und W. STAIB:
Untersuchungen zur gluconeogenetischen Wirkung von Cortisol.
Acta Endocrinol. 60 (1969), 4-12

216. LONG, C.N.H., O.K. SMITH, and E.G.FRY:
Actions of cortisol and related compounds on carbohydrate and protein metabolism. In: "Metabolic Effects of Adrenal Hormones"; ed. by G.E.W. WOLSTENHOLME and M. O'CONNOR.
J. & A. Churchill Ltd., London (1960), 4-19

217. MUNCK, A., and S.B. KORITZ:
Studies on the mode of action of glucocorticoids in rats. I. Early effects of cortisol on blood glucose and on glucose entry into muscle, liver and adipose tissue.
Biochim. Biophys. Acta 57 (1962), 310-317

218. THORN, G.W., A.E. RENOLD, and G.F. CAHILL jr:
The adrenal and diabetes. Some interactions and interrelations.
Diabetes 8 (1959), 337-351

219. ASHMORE, J., S.R. WAGLE, and T. UETE:
Studies on gluconeogenesis.
Adv. Enzyme Regul. 2 (1964)), 101-114

220. HAYNES, R.C., jr:
The control of gluconeogenesis by adrenal cortical hormones.
Adv. Enzyme Regul. 3 (1965), 111-119

221. EISENSTEIN, A.B.:
Adrenocortical hormones and carbohydrate synthesis in liver.
Adv. Enzyme Regul. 3 (1965), 121-135

222. WEBER, G., R.L. SINGHAL, and S.K. SRIVASTAVA:
Action of glucocorticoid as inducer and insulin as suppressor of biosynthesis of hepatic gluconeogenic enzymes.
Adv. Enzyme Regul. 3 (1965), 43-75

223. WEBER, G., R.S. SINGHAL, N.B. STAMM, and S.K. SRIVASTAVA:
Hormonal induction and suppression of liver enzyme biosynthesis.
Fed. Proc. 24 (1965), 745-754

224. WEBER, G.:
Action of glucocorticoid hormone at the molecular level.
In "Functions of the Adrenal Cortex"- Vol. 2; ed. by K.W. McKERNS.
North Holland Publishing Company, Amsterdam (1968), 1059-1135

225. RAY, P.D.:
Adrenal glucocorticoids and gluconeogenesis.
ibid., 1137-1176

226. ASHMORE, J., and D. MORGAN:
Metabolic effects of adrenal glucocorticoid hormones. Carbohydrate, protein, lipid, and nucleic acid metabolism.
In "The Adrenal Cortex"; ed. by A.B. EISENSTEIN.
J. & A. Churchill Ltd., London (1967), 249-267

227. LANDAU, B.R.:
Adrenal steroids and carbohydrate metabolism.
Vitam. Horm. 23 (1965), 1-59

228. KRÖNER, H. und W. STAIB:
Zum Wirkungsmechanismus der Nebennierenrindenhormone.
Hippokrates 38 (1967), 709-714

229. SEUBERT, W., H.V. HENNING, W. SCHONER, and M. L'AGE:
Effects of cortisol on the levels of metabolites and enzymes controlling glucose production from pyruvate.
Adv. Enzyme Regul. 6 (1968), 153-187

230. HAYNES, R.C., jr., and Y.S. LU:
Measurement of cortisol-stimulated gluconeogenesis in the rat.
Endocrinology 85 (1969), 811-814

231. DREWS, J.:
Klinische und biochemische Wirkungen der Glukokortikoide, dargestellt am Beispiel des Cushing-Syndroms.
Med. Klin. 64 (1969), 773-780

232. KENNEY, F.T.:
Hormonal regulation of synthesis of liver enzymes. In "Mammalian Protein Metabolism".
Vol.IV; ed. by H.N. MUNRO
Academic Press, New York, London (1970), 131-176

233. CAHILL, G.F., jr.:
Action of adrenal cortical steroids on carbohydrate metabolism.
In "The Human Adrenal Cortex"; ed. by N.P. CHRISTY.
Harper & Row, Publishers, New York, Evanston, San Francisco, London (1971), 205-239

234. BAXTER, J.D., and P.H. FORSHAM:
Tissue effects of glucocorticoids.
Am.J.Med. 53 (1972), 573-589

235. EISENSTEIN, A.:
Effects of adrenal cortical hormones on carbohydrate, protein, and fat metabolism.
Am.J.Clin.Nutr. 26 (1973), 113-120

236. THOMPSON, E.B., and M.E. LIPPMAN:
Mechanism of action of glucocorticoids.
Metabolism 23 (1974), 159-202

237. MUNCK, A., and K. LEUNG:
Glucocorticoid receptors and mechanisms of action. In "Receptors and Mechanism of Action of Steroid Hormones" - Part II; ed. by J.R.PASQUALINI.
Marcel Dekker, Inc., New York, Basel (1977), 311-397

238. HAYNES, R.C. jr.:
Studies of an in vitro effect of glucocorticoids on gluconeogenesis.
Endocrinology 71 (1962), 399-406

239. OJI, N., and W.W. SHREEVE:
Acute effects of hydrocortisone on gluconeogenesis from ^{14}C - and ^{3}H - labeled substrates in intact rats.
Endocrinology 80 (1967), 1062-1068

240. KENDYSH, I.N., and B.B. MOROZ:
Role of different precursors in the synthesis of liver glycogen during cortisol administration.
Acta Endocrinol. 71 (1972), 365-373

241. WAKAT, D.K., and R.C. HAYNES jr.:
Glucocorticoid-stimulated utilization of substrates in hepatic mitochondria.
Arch.Biochem.Biophys. 184 (1977), 561-571

242. OJI, N., R.H. SLAVINSKI, and W.W. SHREEVE:
Effect of glucocorticoids on gluconeogenesis from labeled malate in the perfused rat liver.
Endocrinology 89 (1971), 1109-1116

243. De WULF, H., and H.G. HERS:
The stimulation of glycogen synthesis and of glycogen synthetase in the liver by glucocorticoids.
Eur.J.Biochem. 2 (1967), 57-60

244. De WULF, H., and H.G. HERS:
The role of glucose, glucagon and glucocorticoids in the regulation of liver glycogen synthesis.
Eur.J.Biochem. 6 (1968), 558-564

245. STALMANS, W., H. De WULF, B. LEDERER, and H.G. HERS:
The effect of glucose and of a treatment by glucocorticoids on the inactivation in vitro of liver glycogen phosphorylase.
Eur.J.Biochem. 15 (1970), 9-12

246. STALMANS, W., H. De WULF, and H.G. HERS:
The control of liver glycogen synthetase phosphatase by phosphorylase.
Eur.J.Biochem. 18 (1971), 582-587

247. HERS, H.G., H. De WULF, and W. STALMANS:
The control of glycogen metabolism in the liver.
FEBS.Lett. 12 (1970), 73-82

248. HERS, H.G., W. STALMANS, H. De WULF, M. LALOUX, and L. HUE:
The control of glycogen metabolism in the liver.
In "Regulation of Hepatic Metabolism"; ed. by F.LUNDQUIST and N.TYGSTRUP. Munksgaard, Copenhagen (1974), 237-249

249. KREUTNER, W., and N.D. GOLDBERG:
Dependence on insulin of the apparent hydrocortisone activation of hepatic glycogen synthetase.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 58 (1967), 1515-1519

250. NICHOLS, W.K., and N.D. GOLDBERG:
The relationship between insulin and apparent glucocorticoid-promoted activation of hepatic glycogen synthetase.
Biochim.Biophys.Acta 279 (1972), 245-259

251. HANOUNE, J., and A.M. CHAMBAUT:
Early responses of liver to cortisone in alloxan-diabetic rats.
Horm.Metab.Res. 4 (1972), 254-256

252. FEIGELSON, M., and P. FEIGELSON:
Metabolic effects of glucocorticoids as related to enzyme induction.
Adv.Enzyme Regul. 3 (1965), 11-27

253. FEIGELSON, P., F.L. Yu, and J. HANOUNE:
Effect of glucocorticoids on hepatic enzyme induction and purine nucleotid and RNA metabolism.
In "The Human Adrenal Cortex"; ed. by N.P. CHRISTY.
Harper & Row, Publishers, New York, Evanston, San Francisco, London (1971), 257-272

254. CHRISTENSEN, H.N.:
Action of cortisol on trapping of amino acids by the liver.
In "Metabolic Effects of Adrenal Hormones"; ed. by G.E.W. WOLSTENHOLME and M. O'CONNOR.
J. & A. Churchill Ltd., London (1960), 56-64

255. KAPLAN, S.A., and C.S. NAGAREDA:
Effects of hydrocortisone and adrenalectomy on uptake of α-aminoisobutyric acid.
Am.J.Physiol. 200 (1961), 1035-1038

256. RIGGS, T.R.:
Hormones and transport across cell membranes.
In "Biochemical Actions of Hormones - Vol.I"; ed.by G. LITWACK.
Academic Press, New York, London (1970), 157-208

257. HANOUNE, J., A.M. CHAMBAUT, and A. JOSIPOWICZ:
The glucose effect and cortisone action upon rat liver and muscle protein metabolism.
Arch.Biochem.Biophys. 148 (1972), 180-184

258. KAPLAN, S.A., and S.C. NAGAREDA SHIMIZU:
Free amino acid and amine concentrations in liver: effects of hydrocortisone and fasting.
Am.J.Physiol. 202 (1962), 695-698

259. BETHEIL, J.J., M. FEIGELSON, and P. FEIGELSON:
The differential effects of glucocorticoid on tissue and plasma amino acid levels.
Biochim.Biophys.Acta 104 (1965), 92-97

260. LONG, C.N.H., B. KATZIN, and E.G. FRY:
The adrenal cortex and carbohydrate metabolism.
Endocrinology 26 (1940), 309-344

261. DRURY, D.R.:
Control of blood sugar.
J. Clin. Endocrinol. 2 (1942), 421-430

262. LONG, C.N.H.:
A discussion of the mechanism of action of adrenal cortical hormones on carbohydrate and protein metabolism.
Endocrinology 30 (1942), 870-883

263. INGLE, D.J.:
Problems relating to the adrenal cortex.
Endocrinology 31 (1942), 419-438

264. RUDMAN, D., and M. Di GIROLAMO:
Effect of adrenal cortical steroids on lipid metabolism.
In "The Human Adrenal Cortex"; ed. by N.P. CHRISTY.
Harper & Row, Publishers, New York, Evanston, San Francisco, London (1971), 241-255

265. LIVINGSTON, J.N., and D.H. LOCKWOOD:
Effect of gluco corticoids on the glucose transport system of isolated fat cells.
J. Biol. Chem. 250 (1975), 8353-8360

266. MUNCK, A., and D.A. YOUNG:
Corticosteroids and lymphoid tissue. In "Handbook of Physiology-Endocrinology VI: Adrenal Gland";
ed. by H. BLASCHKO, G.SAYERS, and A.D. SMITH.
American Physiological Society, Washington,D.C. (1975), 231-243

267. BOJAR, H. und W. STAIB:
Zum Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide im lymphatischen System.
Hippokrates 44 (1973), 318-321

268. MUNCK, A.:
Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: old and new evidence, molecular mechanisms, and physiological significance.
Perspect. Biol. Med. 14 (1971), 265-289

269. LEUNG, K., and A. MUNCK:
Peripheral actions of glucocorticoids.
Annu. Rev. Physiol. 37 (1975), 245-272

270. RAMEY, E.R.:
Corticosteroids and skeletal muscle.
In "Handbook of Physiology - Endocrinology VI: Adrenal Gland";
ed. by H. BLASCHKO, G. SAYERS, and A.D. SMITH.
American Physiological Society, Washington,D.C. (1975), 245-261

271. SMITH, O.K.:
Effect of cortisol on the metabolism of glucose in eviscerated adrenalectomized-diabetic rats.
Endocrinology 82 (1968), 447-452

272. RANDLE, P.J., and H.E. MORGAN:
Regulation of glucose uptake by muscle.
Vitam.Horm. 20 (1962), 199-249

273. GOLDMAN, J.K., and L.A. FROHMAN:
Effects of glucocorticoid administration to rats on in vitro intermediary metabolism.
J. Pharmacol. Exp.Ther. 188 (1974), 310-317

274. CHAUDRY, I.H., N.S. ADZICK, M.M. SAYEED, and A.E. BAUE:
Effect of hydrocortisone and dexamethasone on xylose uptake by isolated rat soleus muscle.
Biochim.Biophys.Acta 399 (1975), 85-89

275. MAYER, M., N. KAISER, R.J. MILHOLLAND, and F. ROSEN:
The binding of dexamethasone and triamcinolone acetonide to glucocorticoid receptors in rat skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 249 (1974), 5236-5240

276. MAYER, M., and F. ROSEN:
Glucocorticoid receptors in skeletal muscle.
Isr.J.Med.Sci. 11 (1975), 699-707

277. MAYER, M., and F. ROSEN:
Interaction of anabolic steroids with glucocorticoid receptor sites in rat muscle cytosol.
Am.J.Physiol. 229 (1975), 1381-1386

278. MAYER, M., E. SHAFRIR, N. KAISER, R.J. MILHOLLAND, and F. ROSEN:
Interaction of glucocorticoid hormones with rat skeletal muscle; catabolic effects and hormone binding.
Metabolism 25 (1976), 157-167

279. BALLARD, P.L., J.D. BAXTER, S.J. HIGGINS, G.G. ROUSSEAU, and G.M. TOMKINS:
General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissues.
Endocrinology 94 (1974), 998-1002

280. JEANRENAUD, B., and A.E. RENOLD:
Metabolic effects of corticosteroids. In " Handbuch des Diabetes mellitus- Band I"; hrsg. von E.F. PFEIFFER.
J.F.Lehmann-Verlag, München (1969), 591-613

281. HERRMANN, J. und W. STAIB:
Beziehung zwischen Lipolyse, Gluconeogenese und Insulinsekretion nach Cortisolgabe an Ratten.
Eur.J.Biochem. 7 (1969), 427-433

282. ROSS, B.D., R. HEMS, R.A. FREEDLAND, and H.A. KREBS:
Carbohydrate metabolism of the perfused rat liver.
Biochem.J. 105 (1967), 869-875

283. WILLIAMSON, J.R., E.T. BROWNING, and M.S. OLSON:
Interrelations between fatty acid oxidation and the control of gluconeogenesis in perfused rat liver.
Adv.Enzyme Regul. 6 (1968), 67-100

284. RUDERMAN, N.B., C.J. TOEWS, and E. SHAFRIR:
Role of free fatty acids in glucose homeostasis.
Arch.Intern.Med. 123 (1969), 299-313

285. RANDLE, P.J., P.B. GARLAND, C.N. HALES, and E.A. NEWSHOLME:
The glucose fatty - acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.
Lancet 1 (1963), 785-789

286. RANDLE, P.J.:
The glucose fatty acid cycle.
In " On the Nature and Treatment of Diabetes"; ed. by B.S. LEIBEL and G.A. WRENSHALL.
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, New York, London, Milan, Tokyo, Buenos Aires (1965), 361-367

287. NEELY, J.R., and H.E. MORGAN:
Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle.
Annu.Rev.Physiol. 36 (1974), 413-459

288. RENNIE, M.J., W.W. WINDER, and J.O. HOLLOSZY:
A sparing effect of increased plasma fatty acids on muscle and liver glycogen content in the exercising rat.
Biochem.J. 156 (1976), 647-655

289. RENNIE, M.J., and J.O. HOLLOSZY:
Inhibition of glucose uptake and glycogenolysis by availability of oleate in well - oxygenated perfused skeletal muscle.
Biochem.J. 168 (1977), 161-170

290. STÖRMER, B., W. JANSSEN, H. REINAUER, W. STAIB und S. HOLLMANN:
Enzymaktivitäten und Substratkonzentrationen in der Rattenleber unter den Bedingungen der Cortisol - Gluconeogenese.
Hoppe - Seyler's Z. Physiol.Chem. 351 (1970), 296-304

291. STÖRMER, B. und W. STAIB:
Das Verhalten von Acetyl - CoA in der Rattenleber nach Glucocorticoidgabe.
Steroidologia 2 (1971), 296-302

292. ENGEL, F.L., S. SCHILLER, and E.I. PENTZ:
Studies on the nature of the protein catabolic response to adrenal cortical extract.
Endocrinology 44 (1949), 458-475

293. KIM, Y.S., and Y. KIM:
Glucocorticoid inhibition of protein synthesis in vivo and in vitro.
J.Biol.Chem. 250 (1975), 2293-2298

294. HÜBENER, H.J.:
Über den Mechanismus der Gluconeogenese nach oraler Cortisol-Gabe.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 322 (1960), 135-141

295. EWALD, W., H.J. HÜBENER und E. WIEDEMANN:
Weitere Untersuchungen über die Enzym-Induktion durch Cortisol in der Leber.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 333 (1963), 57-70

296. MANCHESTER, K.L.:
Sites of hormonal regulation of protein metabolism.
G.Glucocorticoids. In "Mammalian Protein Metabolism", Vol.IV; ed. by H.N. MUNRO.
Academic Press, New York and London (1970), 273-275

297. Mc NURLAN, M.A., V.M. PAIN, and P.J. GARLICK:
Conditions that alter rates of tissue protein synthesis in vivo.
Biochem.Soc.Trans. 8 (1980), 283-285

298. MILLWARD, D.J., P.J. GARLICK, D.O. NNANYELUGO, and J.C. WATERLOW:
The relativ importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass.
Biochem.J. 156 (1976), 185-188

299. PREEDY, V.R., V.M. PAIN, and P.J. GARLICK:
Comparison of rates of protein synthesis in skeletal muscle measured in vivo and in the perfused hemicorpus.
Biochem.Soc.Trans. 7 (1979), 1040-1042

300. FULKS, R.M., J.B. LI, and A.L. GOLDBERG:
Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm.
J.Biol.Chem. 250 (1975), 290-298

301. MILLWARD, D.J.:
Protein turnover in skeletal muscle. I. The measurement of rates of synthesis and catabolism of skeletal muscle protein using $[^{14}C]Na_2CO_3$ to label protein.
Clin.Sci. 39 (1970), 577-590

302. SCOPES, R.K.:
Characterization and study of sarcoplasmatic proteins.
In "The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food", Vol.2; ed. by E.J. BRISKEY, R.G. CASSENS, and B.B. MARSH.
The University of Wisconsin Press, Madison, Milwaukee, London (1970), 471-492

303. FUNABIKI, R., and R.G. CASSENS:
Heterogeneous turnover of myofibrillar protein.
Nature (New Biol.) 236 (1972), 249

304. NISHIZAWA, N., M. SHIMBO, T. NOGUCHI, S. HAREYAMA, and R. FUNABIKI:
Effect of starvation, refeeding and hydrocortisone administration on turnover of myofibrillar proteins estimated by urinary excretion of N^{τ} - methylhistidine in the rat.
Agric.Biol.Chem. 42 (1978), 2083-2089

305. DÖLKEN, G., and D. PETTE:
Turnover of several glycolytic enzymes in rabbit heart, soleus muscle and liver.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 355 (1974), 289-299

306. PETTE, D., and G. DÖLKEN:
Some aspects of regulation of enzyme levels in muscle energy-supplying metabolism.
Adv. Enzyme Regul. 13 (1975), 355-377

307. ENGEL, F.L.:
A consideration of the roles of the adrenal cortex and stress in the regulation of protein metabolism.
Rec.Progr.Horm.Res. 6 (1951), 277-308

308. INGLE, D.J., M.C. PRESTRUD, and J.E. NEZAMIS:
Effect of adrenalectomy upon level of blood amino acids in the eviscerated rat.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 67 (1948), 321-322

309. BONDY, P.K., D.J. INGLE, and R.C. MEEKS:
Influence of adrenal cortical hormones upon the level of plasma amino acids in eviscerate rats.
Endocrinology 55 (1954), 354-360

310. TILTON, M.M., G. TORRALBA, and D.J. INGLE:
Effect of hydrocortisone on the level of plasma amino acids after removal of the intra-abdominal organs in the rat.
Metabolism 4 (1955), 424-426

311. CALDWELL, M. D., W.W. LACY, and J.H. EXTON:
Effects of adrenalectomy on the amino acid and glucose metabolism of perfused rat hindlimbs.
J.Biol. Chem. 253 (1978), 6837-6844

312. KAPLAN, S.A., and C.S. NAGAREDA SHIMIZU:
Effects of cortisol on amino acids in skeletal muscle and plasma.
Endocrinology 72 (1963), 267-272

313. RYAN, W.L., and M.J. CARVER:
Immediate and prolonged effects of hydrocortisone on the free amino acids of rat skeletal muscle.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 114 (1963), 816-819

314. DIETERICH, T.:
Der Wirkungsmechanismus des Cortisols auf die Gluconeogenese.
Dissertatio med., Universität Düsseldorf (1966)

315. De LOECKER, W., and M.L. STAS:
Effect of cortisol treatment on free amino acid levels in rats.
J. Endocr. 59 (1973), 57-63

316. MILLER, L.L.:
The role of the liver and the non-hepatic tissues in the regulation of free amino acid levels in the blood.
In "Amino Acid Pools", ed. by J.T. HOLDEN.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York (1962), 708-721

317. GAN, J.C., and H. JEFFAY:
Origins and metabolism of the intracellular amino acid pools in rat liver and muscle.
Biochim. Biophys.Acta 148 (1967), 448-459

318. WOOL, I.G.:
Corticosteroids and accumulation of ^{14}C-labeled amino acids and histamine by isolated rat diaphragm.
Am.J.Physiol. 199 (1960), 715-718

319. WOOL, I.G.:
Accumulation of substrate by isolated rat diaphragm: a possible mechanism for the anti-inflammatory action of corticosteroids.
Nature 186 (1960), 728

320. KOSTYO, J.L., and J.E. SCHMIDT:
Inhibitory effects of cardiac glycosides and adrenal steroids on amino acid transport.
Am.J.Physiol. 204 (1963), 1031-1038

321. KOSTYO, J.L.:
In vitro effects of adrenal steroid hormones on amino acid transport in muscle.
Endocrinology 76 (1965), 604-613

322. KOSTYO, J.L., and A.F. REDMOND:
Role of protein synthesis in the inhibitory action of adrenal steroid hormones on amino acid transport by muscle.
Endocrinology 79 (1966), 531-540

323. ELSAS, L.J., I. ALBRECHT, W. KOEHNE, and L.E. ROSENBERG:
Effect of puromycin on insulin - stimulated amino-acid transport in muscle.
Nature 214(1967), 916-917

324. HEATON, J.H., and T.D. GELEHRTER:
Derepression of amino acid transport by amino acid starvation in rat hepatoma cells.
J.Biol.Chem. 252 (1977), 2900-2907

325. GELEHRTER, T.D.:
Glucocorticoids and the plasma membrane. In " Glucocorticoid Hormone Action"; ed. by J.D. BAXTER and G.G. ROUSSEAU.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 561-574

326. MANCHESTER, K.L., P.J. RANDLE, and F.G. YOUNG:
The effect of growth hormone and of cortisol on the response of isolated rat diaphragm to the stimulating effect of insulin on glucose uptake and on incorporation of amino acids into protein.
J. Endocrinol. 18 (1959), 395-408

327. WOOL, I.G., and E.I. WEINSHELBAUM:
Incorporation of ^{14}C-amino acids into protein of isolated diaphragms: role of adrenal steroids.
Am.J.Physiol. 197 (1959), 1089-1092
Am.J.Physiol. 198 (1960), 1111-1114

328. NAGAREDA SHIMIZU, C.S., and S.A. KAPLAN:
Effects of cortisone on in vitro incorporation of glycine into protein of rat diaphragm.
Endocrinology 74 (1964), 709-713

329. WOOL, I.G., and E.I. WEINSHELBAUM:
Adrenal cortical hormone and incorporation of ^{14}C from amino acid precursors into muscle protein.
Am. J. Physiol. 198 (1960), 360-362

330. KRÖNER, H. und W. STAIB:
Cortisolwirkungen auf den Protein- und Energiestoffwechsel in der Peripherie.
Acta Endocrinol. 59 (1968), 193-202

331. SHOJI, S., and R.J. T. PENNINGTON:
The effect of cortisone on protein breakdown and synthesis in rat skeletal muscle.
Mol.Cell.Endocrinol. 6 (1977), 159-169

332. GOLDBERG, A.L., and G.E. GRIFFIN:
Hormonal control of protein synthesis and degradation in rat skeletal muscle.
J.Physiol. 270 (1977), 51P -52P

333. RANNELS, S.R., J.B. LI, and L.S. JEFFERSON:
Amino acid release and protein turnover in perfused skeletal muscle of fasted normal and adrenalectomized rats.
Diabetes 25 (1976), 333 (Abstr.)

334. RANNELS, S.R., D.E. RANNELS, A.E. PEGG, and L.S. JEFFERSON:
Glucocorticoid effects on peptide-chain initiation in skeletal muscle and heart.
Am.J.Physiol. 235 (1978), E 134 - E 139

335. Mc GRATH, J.A., and D.F. GOLDSPINK:
The effects of glucocorticoids on protein turnover and growth of different striated muscles in the rat.
Biochem.Soc.Trans. 8 (1980), 448-449

336. PETERS, R.F., M.C. RICHARDSON, M.SMALL, and A.M. WHITE:
Some biochemical effects of triamcinolone acetonide on rat liver and muscle.
Biochem.J. 116 (1970), 349-355

337. GOLDBERG, A.L., and D.F. GOLDSPINK:
Influence of food deprivation and adrenal steroids on DNA synthesis in various mammalian tissues.
Am.J.Physiol. 228 (1975), 310-317

338. BULLOCK, G., A.M. WHITE, and J. WORTHINGTON:
The effects of catabolic and anabolic steroids on amino acid incorporation by skeletal-muscle ribosomes.
Biochem.J. 108 (1968), 417-425

339. ELLIOTT, P., R.F. PETERS, and A.M. WHITE:
A study of the relationship between glucocorticoid-induced weight loss in rats and the activity of skeletal-muscle and cardiac-muscle ribosomes in vitro.
Biochem.J. 125 (1971), 106P-107P

340. BULLOCK, G.R., E.E. CARTER, P. ELLIOTT, R.F. PETERS, P. SIMPSON, and A.M. WHITE:
Relative changes in the function of muscle ribosomes and mitochondria during the early phase of steroid-induced catabolism.
Biochem.J. 127 (1972), 881-892

341. YOUNG, V.R., S.C. CHEN, and J. MacDONALD:
The sedimentation of rat skeletal-muscle ribosomes. Effect of hydrocortisone, insulin and diet.
Biochem.J. 106 (1968), 913-919

342. RANNELS, D.E., A.E. PEGG, S.R. RANNELS, and L.S. JEFFERSON:
Effect of starvation on initiation of protein synthesis in skeletal muscle and heart.
Am.J.Physiol. 235 (1978), E126-E133

343. FLAIM, K.E., M.E. COPENHAVER, and L.S. JEFFERSON:
Effects of diabetes on protein synthesis in fast- und slow-twitch rat skeletal muscle.
Am.J.Physiol. 239 (1980), E88-E95

344. CLARK, A.F., and P.J. VIGNOS:
Experimental corticosteroid myopathy:
effect on myofibrillar ATPase activity and protein degradation.
Muscle & Nerve 2 (1979), 265-273

345. PONGRATZ, D.:
Glukokortikoidinduzierte Myopathien.
Deutsches Ärzteblatt 78, Heft 30 (1981), 1458-1462

346. DAVID, D.S., M.H. GRIECO, and P. CUSHMAN jr.:
Adrenal glucocorticoids after twenty years: a review of their clinically relevant consequences.
J.Chron.Dis. 22 (1970), 637-711

347. HOBERMAN, H.D.:
Endocrine regulation of amino acid and protein metabolism during fasting.
Yale J.Biol.Med. 22 (1950), 341-367

348. GOLDBERG, A.L.:
Protein turnover in skeletal muscle. II. Effects of denervation and cortisone on protein catabolism in skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 244 (1969), 3223-3229

349. GOLDBERG, A.L., and H.M. GOODMAN:
Relationship between cortisone and muscle work in determining muscle size.
J. Physiol. 200 (1969), 667-675

350. TICE, L.W., and A.G. ENGEL:
The effects of glucocorticoids on red and white muscles in the rat.
Am.J.Pathol. 50 (1967), 311-322

351. McGRATH, J.A., and D.F. GOLDSPINK:
The effects of cortisone treatment on the protein turnover of the soleus muscle after immobilization.
Biochem.Soc.Trans. 6 (1978), 1017-1019

352. GOLDSPINK, D.F.:
Changes in the size and protein turnover of the soleus muscle in response to immobilization or denervation.
Biochem.Soc.Trans. 6 (1978), 1014-1017

353. GOLDSPINK, D.F.:
The influence of passive stretch on the growth and protein turnover of the denervated extensor digitorum longus muscle.
Biochem.J. 174 (1978), 595-602

354. GOLLNICK,P.D., K. PIEHL, J. KARLSSON,and B. SALTIN:
Glycogen depletion patterns in human skeletal muscle fibers after varying types and intensities of exercise.
In "Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise"; ed. by H. HOWALD and J.R. POORTMANS.
Birkhäuser Verlag, Basel (1975), 416-421

355. ARMSTRONG, R.B., C.W. SAUBERT IV, W.L. SEMBROWICH, R.E. SHEPHERD,and P.D. GOLLNICK:
Glycogen depletion in rat skeletal muscle fibers during exercise.
ibid., 397-401

356. GOLDBERG, A.L., M. TISCHLER, G. DeMARTINO,and G. GRIFFIN:
Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle.
Fed. Proc. 39 (1980), 31-36

357. GOLDBERG, A.L., M. TISCHLER,and P. LIBBY:
Regulation of protein degradation in skeletal muscle.
Biochem.Soc.Trans. 8 (1980), 497

358. TISCHLER, M.E.:
Effect of glucocorticoids on protein and amino acid metabolism in muscle from fasted rats.
Fed.Proc. 38 (1979), 283 (Abstr.)

359. TOMAS, F.M., H.N. MUNRO,and V.R. YOUNG:
Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N^{τ}-methylhistidine.
Biochem.J. 178 (1979), 139-146

360. RENNIE, M.J., S. ROSOCHACKI, P. QUARTEY-PAPAFIO,and D.J. MILLWARD:
Intracellular free 3-methylhistidine concentration as an index of protein degradation.
Biochem.Soc.Trans. 8 (1980), 355

361. YOUNG, V.R., and H.N. MUNRO:
N^t -methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview.
Fed.Proc. 37 (1978), 2291-2300

362. NISHIZAWA, N., T. NOGUCHI, S. HAREYAMA, and R. FUNABIKI:
Free and bound-form N^t -methylhistidines in acid-soluble fraction of rat muscle: the effect of starvation, protein deprivation or hydrocortisone-treatment.
Agric.Biol.Chem. 43 (1979), 177-179

363. MUNRO, H.N., and V.R. YOUNG:
3-methylhistidine as an index of rate of muscle protein breakdown.
Klinische Anästhesiologie und Intensivtherapie, Band 13 (1977), 35-42
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

364. FUNABIKI, R., Y. WATANABE, N. NISHIZAWA, and S. HAREYAMA:
Quantitative aspect of the myofibrillar protein turnover in transient state on dietary protein depletion and repletion revealed by urinary excretion of N^t -methylhistidine.
Biochim.Biophys.Acta 451 (1976), 143-150

365. SCAFARCZYK, A., J.M. MORETTI, J. BOISSIN, and I. ASSENMACHER:
Effect of time of administration of an inflammatory agent on plasma corticosterone and haptoglobin levels in the rat.
Endocrinology 94 (1974), 284-287

366. DALLMAN, M.F., and M.T. JONES:
Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat.
Endocrinology 92 (1973), 1367-1375

367. POLLARD, I., J.R. BASSETT, and K.D. CAIRN-CROSS:
Plasma glucocorticoid elevation and ultrastructural changes in the adenohypophysis of the male rat following prolonged exposure to stress.
Neuroendocrinology 21 (1976), 312-330

368. BUCHANAN, W.E., and T.B. SCHWARTZ:
Lysosomal enzyme activity in heart and skeletal muscle of cortisone-treated rats.
Am.J.Physiol. 212 (1967), 732-736

369. GOLDSTEIN, I.M.:
Effect of steroids on lysosomes.
Transplant.Proc. 7 (1975), 21-24

370. MAYER, M., and F. ROSEN:
Interaction of glucocorticoids and androgens with skeletal muscle.
Metabolism 26 (1977), 937-962

371. MAYER, M., R. AMIN, R.J. MILHOLLAND, and F. ROSEN:
Possible significance of myofibrillar protease in muscle catabolism. Enzyme activity in dystrophic, tumor-bearing, and glucocorticoid-treated animals.
Exp.Mol.Pathol. 25 (1976), 9-19

372. THOMPSON, E.B.:
Glucocorticoids and lysosomes.
In "Glucocorticoid Hormone Action"; ed. by J.D. BAXTER and G.G. ROUSSEAU.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 575-581

373. DAHLMANN, B., and H. REINAUER:
Purification and some properties of a, alkaline proteinase from rat skeletal muscle.
Biochem.J. 171 (1978), 803-810

374. RÖTHIG, H.J., N. STILLER, B. DAHLMANN, and H. REINAUER:
Insulin effect on proteolytic activities in rat skeletal muscle.
Horm.Metab.Res. 10 (1978), 101-104

375. DAHLMANN, B., C. SCHROETER, L. HERBERTZ, and H. REINAUER:
Myofibrillar protein degradation and muscle proteinases in normal and diabetic rats.
Biochem.Med. 21 (1979), 33-39

376. BELLAMY, D.:
The interaction of corticosteroids with liver and skeletal muscle in vertebrates with reference to the primary action of hormones of the cortisol-corticosterone type.
In "Endocrine Genetics" - Memoirs of the Society for Endocrinology, No. 15. Ed. by S.G. SPICKETT.
Cambridge University Press, New York (1967), p.43 (zit. nach 370)

377. HERRERA, M.G., D. KAMM, N. RUDERMAN, and G.F. CAHILL jr.:
Non-hormonal factors in the control of gluconeogenesis.
Adv.Enzyme Regul. 4 (1966), 225-235

378. FELIG, P., E. MARLISS, O.E. OWEN, and G.F. CAHILL jr.:
Role of substrate in the regulation of hepatic gluconeogenesis in fasting man.
Adv.Enzyme Regul. 7 (1969), 41-46

379. DUNN, A., M. CHENOWETH, and K. BEVER:
Use of ^{3}H and ^{14}C doubly labeled glucose and amino acids in the study of hormonal regulation of gluconeogenesis in rats.
Fed.Proc. 36 (1977), 245-252

380. EXTON, J.H.:
Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids.
In "Glucocorticoid Hormone Action"; ed. by J.D. BAXTER and G.G. ROUSSEAU.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 535-546

381. DANIEL, P.M., O.E. PRATT, and E. SPARGO:
The effect of adrenalectomy on the movement of amino acids between the skeletal muscles and the blood.
Proc.Physiol.Soc. (1978), 28P-29P

382. HANSON, P.J., and D.S. PARSONS:
The interrelationship between glutamine and alanine in the intestine.
Biochem. Soc. Trans. 8 (1980), 506-509

383. WINDMUELLER, H.E., and A.E. SPAETH:
Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats.
J.Biol.Chem. 255 (1980), 107-112

384. SCHRÖCK, H., and L. GOLDSTEIN:
Interorgan relationships for glutamine metabolism in normal and acidotic rats.
Am.J.Physiol. 240 (1981), E 519- E 525

385. HEMS, D.A.:
Biochemical aspects of renal ammonia formation in metabolic acidosis.
Enzyme 20 (1975), 359-380

386. POGSON, C.I., I.D. LONGSHAW, A. ROOBOL, S.A. SMITH, and G.A.O. ALLEYNE:
Phosphoenolpyruvate carboxykinase and renal gluconeogenesis.
In "Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species"; ed. by R.W. HANSON and M.A. MEHLMAN.
John Wiley & Sons, New York,London,Sydney,Toronto (1976), 335-368

387. GOLDSTEIN, L., H. SCHRÖCK, and C.J. CHA:
Relationship of muscle glutamine production to renal ammonia metabolism.
Biochem.Soc.Trans. 8 (1980), 509-510

388. SAPIR, D.G., T. POZEFSKY, J.P. KNOCHEL, and M. WALSER:
The role of alanine and glutamine in steroid-induced nitrogen wasting in man.
Clin.Sci.Mol.Med. 53 (1977), 215-220

389. OWEN, O.E., and G.F. CAHILL, jr.:
Metabolic effects of exogenous glucocorticoids in fasted man.
J.Clin.Invest. 52 (1973), 2596-2605

390. PALAIOLOGOS, G., and P. FELIG:
Effects of ketone bodies on amino acid metabolism in isolated rat diaphragm.
Biochem.J. 154 (1976), 709-716

391. TISCHLER, M.E.:
Is regulation of proteolysis associated with redox-state changes in skeletal muscle?
Biochem.J. 192 (1980), 963-966

392. AOKI, T.T., C.J. TOEWS, A.A. ROSSINI, N.B. RUDERMAN, and G.F. CAHILL jr.:
Glucogenic substrate levels in fasting man.
Adv.Enzyme Regul. 13 (1975), 329-336

393. GRATTAN, J.F., H. JENSEN, and D.J. INGLE:
The effect of the pituitary adrenocorticotropic hormone and of corticosterone acetate on insulin hypoglycemia and liver glycogen in adrenalectomized mice.
Am.J.Physiol. 134 (1941), 8-11

394. De BODO, R.C., and N.ALTSZULER:
Insulin hypersensitivity and physiological insulin antagonists.
Physiol.Rev. 38 (1958), 389-445

395. De BODO, R.C., R. STEELE, N.ALTSZULER, A. DUNN, and J.S. BISHOP:
On the hormonal regulation of carbohydrate metabolism; studies with C^{14} glucose.
Recent Progr.Horm.Res. 19 (1963), 445-482

396. FRASER, R., F. ALBRIGHT, and P.H. SMITH:
Carbohydrate metabolism - the value of the glucose tolerance test, the insulin tolerance test and the glucose-insulin tolerance test in the diagnosis of endocrinologic disorders of glucose metabolism.
J.Clin.Endocrinol. 1 (1941), 297-306

397. LONG, C.N.H., and F.D.W. LUKENS:
The effects of adrenalectomy and hypophysectomy upon experimental diabetes in the cat.
J.Exp. Med. 63 (1936), 465-490

398. De BODO, R.C., and M.W. SINKOFF:
Anterior pituitary and adrenal hormones in the regulation of carbohydrate metabolism.
Recent Progr.Horm.Res. 8 (1953), 511-563

399. SPRAGUE, R.G., J.L. MASON, and M.H. POWER:
Studies of the effects of adrenal cortical hormones on carbohydrate metabolism in human subjects.
Proc.Am.Diab.Assoc. 9 (1949), 147

400. THORN, G.W., G.F. KOEPF, R.A. LEWIS, and E.F. OLSEN:
Carbohydrate metabolism in Addison's disease.
J.Clin.Invest. 19 (1940), 813

401. INGLE, D.J.:
The production of glycosuria in the normal rat by means of 17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone.
Endocrinology 29 (1941), 649-652

402. INGLE, D.J., R. SHEPPARD, J. S. EVANS, and M.H. KUIZENGA:
A comparison of adrenal steroid diabetes and pancreatic diabetes in the rat.
Endocrinology 37 (1945), 341-356

403. INGLE, D.J.:
Experimental steroid diabetes.
Diabetes 5 (1956), 187-192

404. INGLE, D.J.:
Effects of insulin on excretion of nitrogen in normal, depancreatized, and steroid-diabetic rats.
Diabetes 16 (1967), 18-20

405. NINOMIYA, R., N.F. FORBATH, and G. HETENYI:
Effect of adrenal steroids on glucose kinetics in normal and diabetic dogs.
Diabetes 14 (1965), 729-739

406. ALTSZULER, N.:
Modification of the effects of insulin by hormonal factors.
Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXXII/2 : "Insulin, Part 2"; ed. by A. HASSELBLATT and F.v. BRUCHHAUSEN.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1975), 535-567

407. ALTSZULER, N., A. MORRISON, B. GOTTLIEB, C. BJERKNES, I. RATHGEB, and R. STEELE:
Alteration by fasting of the effects of methyl-prednisolone on carbohydrate metabolism in the normal dog.
Metabolism 23 (1974), 369-374

408. ISSEKUTZ, B.jr., T.B. ISSEKUTZ, and D. ELAHI:
Glucose kinetics during oral glucose tolerance test in normal, methylprednisolone- treated and alloxan diabetic dogs.
Diabetes 23 (1974), 645-650

409. CHRISTY, N.P.:
Cushing's syndrome: the natural disease, pp. 359-394;
Iatrogenic Cushing's syndrome, pp. 395-425.
In " The Human Adrenal Cortex"; ed. by N.P. CHRISTY.
Harper & Row, Publishers; New York, Evanston, San Francisco, London (1971)

410. CONN, J.W., L.H. LOUIS, and M.W. JOHNSTON:
Studies upon mechanisms involved in the induction with adrenocorticotropic hormone of temporary diabetes mellitus in man.
Proc.Am.Diab.Assoc. 8 (1948), 213-239

411. BUNIM, J.J., A.J. KALTMAN, and C. McEWEN:
Diabetogenic effect of cortisone and ACTH in a non-diabetic patient with rheumatoid arthritis.
Am.J.Med. 12 (1952), 125-134

412. BOOKMAN, J.J., S.R. DRACHMAN, L.E. SCHAEFER, and D. ADLERSBERG:
Steroid diabetes in man. The development of diabetes during treatment with cortisone and corticotropin.
Diabetes 2 (1953), 100-110

413. KRAHL, M.E., and C.F. CORI:
The uptake of glucose by the isolated diaphragm of normal, diabetic, and adrenalectomized rats.
J.Biol.Chem. 170 (1947), 607-618

414. KIPNIS, D.M., and C.F. CORI:
Studies of tissue permeability. VI. The penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in the diaphragm of diabetic rats.
J.Biol.Chem. 235 (1960), 3070-3075

415. HERMAN, M.S., and E.R. RAMEY:
Effect of hydrocortisone and epinephrine on glucose uptake by the rat diaphragm.
Endocrinology 67 (1960), 650-656

416. RIDDICK, F.A., D.M. REISLER, and D.M. KIPNIS:
The sugar transport system in striated muscle. Effect of growth hormone, hydrocortisone and alloxan diabetes.
Diabetes 11 (1962), 171-178

417. MORGAN, H.E., M.J. HENDERSON, D.M. REGEN, and C.R. PARK:
Regulation of glucose uptake in heart muscle from normal and alloxan-diabetic rats: the effects of insulin, growth hormone, cortisone, and anoxia.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 82 (1959), 387-402

418. PARK, C.R., and H.E. MORGAN:
Glucose transport and phosphorylation in muscle of diabetic animals.
Diabetes 9 (1960), 250-253

419. MORGAN, H.E., D.M. REGEN, M.J. HENDERSON, T.K. SAWYER, and C.R. PARK:
Regulation of glucose uptake in muscle.
VI. Effects of hypophysectomy, adrenalectomy, growth hormone, hydrocortisone, and insulin on glucose transport and phosphorylation in the perfused rat heart.
J.Biol.Chem. 236 (1961), 2162-2168

420. SOLS, A.:
Regulation of liver glucokinase and muscle hexokinase.
In "On the Nature and Treatment of Diabetes"; eds. B.S. LEIBEL and G.A. WRENSHALL.
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, New York, London, Milan, Tokyo, Buenos Aires (1965), 118-128

421. MORGAN, H.E., M.J. HENDERSON, D.M. REGEN, and C.R. PARK:
Regulation of glucose uptake in muscle.
I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated, perfused heart of normal rats.
J.Biol.Chem. 236 (1961), 253-261

422. FAIN, J.N.:
Effects of dexamethasone and growth hormone on fatty acid mobilization and glucose utilization in adrenalectomized rats.
Endocrinology 71 (1962), 633-635

423. GOODMAN, H.M., and E. KNOBIL:
Some endocrine factors in regulation of fatty acid mobilization during fasting.
Am.J.Physiol. 201 (1961), 1-3

424. RANDLE, P.J., E.A. NEWSHOLME, and P.P. GARLAND:
Regulation of glucose uptake by muscle. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles.
Biochem.J. 93 (1964), 652-665

425. KATZEN, H.M., D.D. SODERMAN, and C.E. WILEY:
Multiple forms of hexokinase. Activities associated with subcellular praticulate and soluble fractions of normal and streptozotocin diabetic rat tissues.
J.Biol.Chem. 245 (1970), 4081-4096

426. BERNSTEIN, R.S. and D.M. KIPNIS:
Regulation of rat hexokinase isoenzymes. III. Effects of growth hormone and dexamethasone.
Diabetes 22 (1973), 923-931

427. COLOWICK, S.P., G.T. CORI, and M.W. SLEIN:
The effect of adrenal cortex and anterior pituitary extracts and insulin on the hexokinase reaction.
J.Biol.Chem. 168 (1947), 583

428. BACILA, M., and E.S.G. BARRON:
The effect of adrenal cortical hormones on the anaerobic glycolysis and hexokinase activity.
Endocrinology 54 (1954), 591-603

429. SERRATRICE, G., H. ROUX, R. AQUARON, and A.M. RECORDIER:
Serum and muscle activities (glycolytic and transferase) in human cortisone myopathies. In "Muscle diseases"; eds. N. CANAL, G. SCARLATTO, and J.N. WALTON.
Excerpta medica (1970), 489-496

430. FISHMAN, R.A., and M. REINER:
Failure of hydrocortisone to alter the transport of hexoses into rat brain and other tissues.
J. Neurochem. 19 (1972), 2221-2224

431. MANCHESTER, K.L.:
Insulin and protein metabolism in muscle. In "On the Nature and Treatment of Diabetes"; eds. B.S. LEIBEL and G.A. WRENSHALL.
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, New York, London (1965), 101-115

432. MANCHESTER, K.L.:
Insulin and protein synthesis. In "Biochemical Actions of Hormones". Vol.I.; ed. by G. LITWACK.
Academic Press, New York, London (1970), 267-320

433. CAHILL, G.F. jr., T.T. AOKI, and E.B. MARLISS:
Insulin and muscle protein. In " Handbook of Physiology, Section 7 - Endocrinology I: Endocrine Pancreas"; ed. by D.F. STEINER and N. FREINKEL.
American Physiological Society, Washington, D.C. (1972), pp. 563-577

434. LONDON, D.R.:
Insulin and protein turnover. In "Insulin and Metabolism". ed. by J.S. BAJAJ.
Excerpta Medica, Amsterdam, New York, London (1977), pp. 81-90

435. MANCHESTER, K.L.:
The control by insulin of amino acid accumulation in muscle.
Biochem.J. 117 (1970), 457-465

436. RIGGS, T.R.:
Hormones and transport across cell membranes.
In "Biochemical Actions of Hormones", Vol.I.; ed. by G.LITWACK.
Academic Press, New York, London (1970), pp. 157-208

437. RIGGS, T.R., and K.J. MacKIRAHAN:
Action of insulin on transport of L-alanine into rat diaphragm in vitro. Evidence that the hormone affects only one neutral amino acid transport system.
J.Biol.Chem. 248 (1973), 6450-6455

438. GAZZOLA, G.C., R. FRANCHI-GAZZOLA, P. RONCHI, and G.G. GUIDOTTI:
Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells. III. Formal identification of the A mediation as an adaptive transport system.
Biochim.Biophys.Acta 311 (1973), 292-301

439. CHRISTENSEN, H.N., and M.E. HANDLOGTEN:
Modes of mediated exodus of amino acids from the Ehrlich ascites tumor cell.
J.Biol.Chem. 243 (1968), 5428-5438

440. CHRISTENSEN, H.N.:
Some special kinetic problems of transport.
Adv.Enzymol.32 (1969), 1-20

441. CHRISTENSEN, H.N.:
Amino acid transport systems in animal cells:interrelations and energization.
J.Supramol.Struct. 6 (1977), 205-213

442. GAZZOLA, G.C., V. DALL'ASTA, and G.G. GUIDOTTI:
The transport of neutral amino acids in cultured human fibroblasts.
J.Biol.Chem. 255 (1980), 929-936

443. LOBITZ, C.J., and M.C. NEVILLE:
Control of amino acid transport in the mammary gland of the pregnant mouse.
J.Supramol. Struct. 6 (1977), 355-362

444. STROHFELDT, P.:
Das isoliert perfundierte Hinterbein der Ratte als Modell zur Untersuchung des Muskelstoffwechsels.
Res.exp.Med. 162 (1973), 7-16

445. REIMER, F., G. LÖFFLER, G. HENNIG, and O.H. WIELAND:
The influence of insulin on glucose and fatty acid metabolism in the isolated perfused rat hindquarter.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356 (1975), 1055-1066

446. HÄRING, H., C. CALLE, A. BUG, R. RENNER, K.D. HEPP, and W. KEMMLER:
Insulin binding and insulin action in rat fat cells after adrenalectomy.
Diabetologia 19 (1980), 379-385

447. SUTTER, B.C.J.:
Surrénale et insulinémie chez le rat. II. Corticosurrénale et insuline sérique.
Diabetologia 4 (1968), 295-304

448. BERGAMINI, E., C. GAGLIARDI, and C. PELLEGRINO:
Dependence on insulin of the hydrocortisone effect on muscle glycogen content.
FEBS Letters 4 (1969), 1-3

449. BATES, R.W., and M.M. GARRISON:
Daily changes in concentration of pancreatic and serum insulin and of blood glucose during 5 days of treatment of rats with growth hormone, ACTH, cortisol, dexamethasone, and tolbutamide alone and in combinations.
Metabolism 23 (1974), 947-965

450. BAGDADE, J.D., E. YEE, J. ALBERS, and O.J. PYKALISTO:
Glucocorticoids and triglyceride transport: effects on triglyceride secretion rates, lipoprotein lipase, and plasma lipoproteins in the rat.
Metabolism 25 (1976), 533-542

451. MILLWARD, D.J., D.O. NNANYELUGO, P. BATES, and C.R.C. HEARD:
Muscle and liver protein metabolism in rats treated with glucocorticoids.
Proc.Nutr.Soc. 35 (1976), 47A

452. SERRANO-RIOS, M., F.G. HAWKINS, F. ESCOBAR, J.M. MATO, L.LARRODERA, M. de OYA, and J.L. RODRIGUEZ-MIÑON:
Insulin secretion in Addison's disease: effect of hydrocortisone treatment.
Horm.Metab.Res. 6 (1974), 17-21

453. RASTOGI, K.S., and J. CAMPBELL:
Effect of growth hormone on cortisone-induced hyperinsulinemia and reduction in pancreatic insulin in the mouse.
Endocrinology 87 (1970), 226-232

454. MARCO, J., F. MELANI, R. GOBERNA, W.H. ROLT, and E. F. PFEIFFER:
The effect of prednisolone on insulin secretion in the rat.
Diabetologia 5 (1969), 48 (Abstr.)

455. MALAISSE, W.J., F. MALAISSE-LAGAE, E.F.Mc CRAW, and P.H. WRIGHT:
Insulin secretion in vitro by pancreatic tissue from normal, adrenalectomized, and cortisol-treated rats.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 124 (1967), 924-928

456. LENZEN, S.:
The effect of hydrocortisone treatment and adrenalectomy on insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas.
Endokrinologie 68 (1976), 189-197

457. KAHN, C.R., I.D. GOLDFINE, D.M. NEVILLE jr., J. ROTH, M. GARRISON, and R.W. BATES:
Insulin receptor defect: a major factor in the insulin resistance of glucocorticoid excess.
Endocrinology 92 (Suppl.) (1973), 240

458. OLEFSKY, J.M., J. JOHNSON, F. LIU, P. JEN, and G.M. REAVEN:
The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes.
Metabolism 24 (1975), 517-527

459. KAHN, C.R., I.D. GOLDFINE, M.D. NEVILLE, and P. de MEYTS:
Alterations in insulin binding induced by changes in vivo in the levels of glucocorticoids and growth hormone.
Endocrinology 103 (1978), 1054-1066

460. CIGOLINI, M., and U. SMITH:
Human adipose tissue in culture. VIII. Studies on the insulin-antagonistic effect of glucocorticoids.
Metabolism 28 (1979), 502-510

461. GOODMAN, M.N., and N.B. RUDERMAN:
Insulin sensitivity of rat skeletal muscle: effects of starvation and aging.
Am.J.Physol. 236 (1979), E 519-E 523

462. Le MARCHAND-BRUSTEL, Y., and P. FREYCHET :
Effect of fasting and streptozotocin diabetes on insulin binding and action in the isolated mouse soleus muscle
J.Clin.Invest. 64 (1979), 1505-1515

463. BRADY, L.J., M.N. GOODMAN, F.N. KALISH, and N.B. RUDERMAN:
Insulin binding and sensitivity in rat skeletal muscle: effect of starvation.
Am.J.Physiol. 240 (1981), E184-E190

464. MARCO, J., C. CALLE, D. ROMÁN, M. DÍAZ-FIERROS, M.L. VILLANUEVA, and VALVERDE
Hyperglucagonism induced by glucocorticoid treatment in man.
New Engl.J.Med. 288 (1973), 128-131

465. GELEHRTER, T.D.:
Synergistic and antagonistic effects of glucocorticoids on insulin action.
In "Glucocorticoid Hormone Action"; ed. by J.D. BAXTER and G.G. Rousseau. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), pp. 583-591

466. GRIFFIN, E.E., and K. WILDENTHAL:
Regulation of cardiac protein balance by hydrocortisone: interaction with insulin.
Am.J.Physiol. 234 (1978), E306-E 313

467. De LOECKER, W.:
The effects of cortisol on glycine and leucine incorporation in vivo and in vitro in strips of skeletal rat muscle.
Acta Endocrinol. 52 (1966), 416-424

468. RUDERMAN, N.B., M.N. GOODMAN, C.A. CONOVER, and M. BERGER:
Substrate utilization in perfused skeletal muscle.
Diabetes 28, Suppl. 1 (1979), 13-17

469. SNELL, K.:
Muscle alanine synthesis and hepatic gluconeogenesis.
Biochem.Soc.Trans. 8 (1980), 205-213

470. SNELL, K., and D.A. DUFF:
Alanine and glutamine formation by muscle.
Biochem.Soc.Trans. 8 (1980), 501-504

471. GOLDBERG, A.L., and T.W. CHANG:
Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle.
Fed.Proc. 37 (1978), 2301-2307

472. LEWIS, E.B., T.A. SCHULTZ, E.L. DANIELS, M.M. BLIZIOTES, and W. MONTAGUE:
Prolonged effect of insulin on glucose uptake by rat skeletal muscle.
Biochem.J. 186 (1980), 733-738

473. GOODMAN, M.N., M. BERGER, and N.B. RUDERMAN:
Glucose metabolism in rat skeletal muscle at rest. Effect of starvation, diabetes, ketone bodies and free fatty acids.
Diabetes 23 (1974), 881-888

474. RUDERMAN, N.B., F.W. KEMMER, M.N. GOODMAN, and M. BERGER:
Oxygen consumption in perfused skeletal muscle. Effect of perfusion with aged, fresh and aged-rejuvenated erythrocytes on oxygen consumption, tissue metabolites and inhibition of glucose utilization by acetoacetate.
Biochem.J. 190 (1980), 57-64

475. RANDLE, P.J., P.B. GARLAND, C.N. HALES, E.A. NEWSHOLME, R.M. DENTON, and C.I. POGSON:
Interactions of metabolism and the physiological role of insulin.
Recent Progr.Horm.Res. 22 (1966), 1-44

476. MAIZELS, E.Z., N.B. RUDERMAN, M.N. GOODMAN, and D. LAU:
Effect of acetoacetate on glucose metabolism in the soleus and extensor digitorum longus muscles of the rat.
Biochem.J. 162 (1977), 557-568

477. MUNCK, A.:
The effect of cortisol on glucose uptake by rat epididymal fat pads.
Endocrinology 63 (1961), 178-180

478. MUNCK, A.:
Studies on the mode of action of glucocorticoids in rats.
II. The effects in vivo and in vitro on net glucose uptake by isolated adipose tissue.
Biochim.Biophys.Acta 57 (1962), 318-326

479. FAIN, J.N., R.O. SCOW, and S.S. CHERNICK:
Effects of glucocorticoids on metabolism of adipose tissue in vitro.
J.Biol.Chem. 238 (1963), 54-58

480. YORKE, R.E.:
The influence of dexamethasone on adipose tissue metabolism in vitro.
J.Endocr. 39 (1967), 329-343

481. OLEFSKY, J.M.:
Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes.
J.Clin.Invest. 56 (1975), 1499-1508

482. OVERELL, B.G., S.E. CONDON, and V. PETROW:
The effect of hormones and their analogues upon the uptake of glucose by mouse skin in vitro.
J.Pharm.Pharmacol. 12 (1960), 150-153

483. PLAGER, J.E., and N. MATSUI:
An in vitro demonstration of the anti-insulin action of cortisol on glucose metabolism.
Endocrinology 78 (1966), 1154-1158

484. MORITA, Y., and A. MUNCK:
Effect of glucocorticoids in vivo and in vitro on net glucose uptake and amino acid incorporation by rat-thymus cells.
Biochim.Biophys.Acta 93 (1964), 150-157

485. MUNCK, A.:
Metabolic site and time course of cortisol action on glucose uptake, lactic acid output and glucose-6-phosphate levels of rat thymus cells in vitro.
J.Biol.Chem. 243 (1968), 1039-1042

486. BOYETT, J.D., and J.F. HOFERT:
Studies concerning the inhibition of glucose metabolism in thymus lymphocytes by cortisol and epinephrine.
Endocrinology 91 (1972), 233-239

487. RYAN, N.T., B.C. GEORGE, R. ODESSEY, and R.H. EGDAHL:
Effect of hemorrhagic shock, fasting, and corticosterone administration on leucine oxidation and incorporation into protein by skeletel muscle.
Metabolism 23 (1974), 901

488. GLENN, E.M., B.J. BOWMAN, R.B. BAYER,and C.E. MEYER:
Hydrocortisone and some of its effects on intermediary metabolism. I. In vivo studies.
Endocrinology 68 (1961), 386-410

489. KREBS, H.A.:
Equilibria in transamination systems.
Biochem.J. 54 (1953), 82-86

490. SNELL, K.,and D.A. DUFF:
The release of alanine by rat diaphragma muscle in vitro.
Biochem.J. 162 (1977), 399-403

491. SPYDEVOLD, Ø., E.J. DAVIS,and J. BREMER:
Replenishment and depletion of citric acid cycle intermediates in skeletal muscle. Indication of pyruvate carboxylation.
Eur.J.Biochem. 71 (1976), 155-165

492. CHANG, T.W.,and A.L. GOLDBERG:
The origin of alanine produced in skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 253 (1978), 3677-3684

493. PARDRIDGE, W.M.,and M.B. DAVIDSON:
Alanine metabolism in skeletal muscle in tissue culture.
Biochim.Biophys.Acta 585 (1979), 34-42

494. WHITEHOUSE, S.,and P.J. RANDLE:
Activation of pyruvate dehydrogenase in perfused rat heart by dichloroacetate.
Biochem.J. 134 (1973), 651-653

495. GOODMAN, M.N., N.B. RUDERMAN,and T.T. AOKI:
Glucose and amino acid metabolism in perfused skeletal muscl Effect of dichloroacetate.
Diabetes 27 (1978), 1065-1074

496. BLACKSHEAR, P.J., P.A.H. HOLLOWAY,and K.G.M.M. ALBERTI:
Factors regulating amino acid release from extrasplanchnic tissues in the rat. Interactions of alanine and glutamine.
Biochem.J. 150 (1975), 379-387

497. SPYDEVOLD, Ø.:
Sources of carbon skeleton of alanine released from skeletal muscle.
Acta physiol.scand. 97 (1976), 273-280

498. KERPPOLA, W.:
Accumulation of pyruvic acid in the blood during treatment with cortisone or ACTH,and in Cushing's syndrome.
Acta Med.Scand. 145 (1953), 357-360

499. GITELSON, S.:
The effect of ACTH and cortisone on the blood pyruvic acid level.
Acta Endocrinol. 15 (1954), 225-235

500. FRAWLEY, T.F.:
The role of the adrenal cortex in glucose and pyruvic acid metabolism in man including the use of intravenous hydrocortisone in acute hypoglycemia.
Ann.N.Y. Acad.Sci. 61 (1955), 464-493

501. HENNEMAN, D.H., and J.P. BUNKER:
The pattern of intermediary carbohydrate metabolism in Cushing's syndrome.
Am. J. Med. 23 (1957), 34

502. HENNES, A.R., B.L. WAJCHENBERG, S.S. FAJANS, and J.W. CONN:
The effect of adrenal steroids on blood levels of pyruvic and alpha-ketoglutaric acids in normal subjects.
Metabolism 6 (1957), 339-345

503. FAJANS, S.S.:
Some metabolic actions of corticosteroids.
Metabolism 10 (1961), 951-965

504. ANDERSON, J., and W.D. THOMAS:
Pyruvate excretion in diabetes mellitus and non-diabetic patients on corticosteroids after sodium lactate.
Lancet 2 (1967), 970

505. CHANG, T.W., and A.L. GOLDBERG:
The metabolic fates of amino acids and formation of glutamine in skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 253 (1978), 3685-3695

506. GOLDBERG, A.L., and T.W. CHANG:
Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle.
Fed.Proc. 37 (1978), 2301-2307

507. PORTENHAUSER, R., and O. WIELAND:
Regulation of pyruvate dehydrogenase in mitrochondria of rat liver.
Eur.J.Biochem. 31 (1972), 308-314

508. KERBEY, A.L., P.J. RANDLE, R.H. COOPER, S. WHITEHOUSE, H.T. PASK, and R.M. DENTON:
Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart.
Biochem. J. 154 (1976), 327-348

509. ICHIHARA, A., and E. KOYAMA:
Transaminase of branched-chain amino acids. I. Branched-chain amino acids-α-ketoglutarate transaminase.
J.Biochem. 59 (1966), 160-169

510. MIMURA, T., C. YAMADA, and M.E. SWENDSEID:
Influence of dietary protein levels and hydrocortisone administration on the branched-chain amino acid transaminase activity in rat tissues.
J.Nutr. 95 (1968), 493-497

511. ICHIHARA, A., C. NODA, and K. OGAWA:
Control of leucine metabolism with special reference to branched-chain amino acid transaminase isozymes.
Adv.Enzyme Regul. 11 (1973), 155-166

512. ICHIHARA, A.:
Cellular differentiation and isozymes of branched-chain amino acid transaminase.
Enzyme 15 (1973), 210-223

513. KREBS, H.A., and P. LUND:
Aspects of the regulation of the metabolism of branched-chain amino acids.
Adv.Enzyme Regul. 15 (1977), 375

514. ODESSEY, R., and A.L. GOLDBERG:
Leucine degradation in cell-free extracts of skeletal muscle.
Biochem.J. 178 (1979), 475-489

515. HUTSON, S.M., C.ZAPALOWSKI, T.C.CREE, and A.E. HARPER:
Regulation of leucine and α-ketoisocaproic acid metabolism in skeletal muscle. Effects of starvation and insulin.
J.Biol.Chem. 255 (1980), 2418-2426

516. TISCHLER, M.E., and A.L. GOLDBERG:
Production of alanine and glutamine by atrial muscle from fed and fasted rats.
Am.J.Physiol. 238 (1980), E 487-E 493

517. DUFF, D.A., S.C. PRICE, and K. SNELL:
Effect of hypoglycin on alanine release by skeletal muscles in vitro.
Biochem.Soc.Trans. 8 (1980), 574-575

518. BENDER, D.A.:
Amino acid metabolism.
John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto (1975), pp. 135-141

519. SCRUTTON, M.C., and M.F. UTTER:
The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues.
Annu.Rev.Biochem. 37 (1968), 249-302

520. CRABTREE, B., S.J. HIGGINS, and E.A. NEWSHOLME:
The activities of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase and fructose diphosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates.
Biochem.J. 130 (1972), 391-396

521. NOLTE, J., D. BRDICZKA,and D. PETTE:
Intracellular distribution of phosphoenolpyruvate carboxylase and (NADP) malate dehydrogenase in different muscle types.
Biochim. Biophys. Acta 284 (1972), 497-507

522. McLANE, J.A., and J.O. HOLLOSZY:
Glycogen synthesis from lactate in the three types of skeletal muscle.
J. Biol. Chem. 254 (1979), 6548-6553

523. CONNETT, R.J.:
Glyconeogenesis from lactate in frog striated muscle.
Am. J. Physiol. 237 (1979), C 231- C 236

524. LEE, S.H., and E.J. DAVIS:
Carboxylation and decarboxylation reactions. Anaplerotic flux and removal of citrate cycle intermediates in skeletal muscle.
J. Biol. Chem. 254 (1979), 420-430

525. SNELL, K., and D.A. DUFF:
Muscle phosphoenolpyruvate carboxykinase activity and alanine release in progressively starved rats.
Int. J. Biochem. 10 (1979), 423-426

526. CHIASSON, J.L., M.R. DIETZ, H. SHIKAMA, M. WOOTTEN,and J.H. EXTON:
Insulin regulation of skeletal muscle glycogen metabolism.
Am. J. Physiol. 239 (1980), E 69 - E 74

527. HÄRING, H.U., W. KEMMLER, R. RENNER,and K.D. HEPP:
Initial lag-phase in the action of insulin on glucose transport and cAMP levels in fat cells.
FEBS Lett. 95 (1978), 177-180

528. FELIG,P.,and J. WAHREN:
Amino acid metabolism in exercising man.
J. Clin. Invest. 50 (1971), 2703-2714

529. WAHREN,J., P. FELIG, R. HENDLER,and G. AHLBORG:
Glucose and amino acid metabolism during recovery after exercise.
J. Appl. Physiol. 34 (1973), 838- 845

530. FELIG, P.,and J. WAHREN:
Fuel homeostasis in exercise.
New Engl. J. Med. 293 (1975), 1078- 1084

531. WAHREN, J., P. FELIG, L. HAGENFELDT, R. HENDLER,and G. AHLBORG:
Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids and amino acids during prolonged exercise in man.
In "Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise";
ed. by H. HOWALD and J.R. POORTMANS.
Birkhäuser Verlag, Basel (1975), 144-153

532. WAHREN, J., P. FELIG, R.J. HAVEL,L. JORFELDT, B. PERNOW, and B. SALTIN:
Amino acid metabolism in McArdle's syndrome.
New Engl. J. Med. 288 (1973), 774-777

533. MARLISS, E.B., T.T. AOKI, C.J. TOEWS, P. FELIG, J.J. CONNON, J.KYNER, W.E. HUCKABEE,and G.F. CAHILL jr.:
Amino acid metabolism in lactic acidosis.
Am. J. Med. 52 (1972), 474

534. POZEFSKY, T., and R.G. TANCREDI:
Effects of intrabrachial arterial infusion of pyruvate on forearm tissue metabolism. Interrelationships between pyruvate, lactate and alanine.
J.Clin.Invest. 51 (1972), 2359-2369

535. MORGAN, H.E., and C.F. WHITFIELD:
Regulation of sugar transport in eukaryotic cells.
In "Current Topics in Membranes and Transport, Vol.4";ed. by F. BRONNER and A. KLEINZELLER.
Academic Press, New York, London (1973), 255-303

536. LEWIS, S.B., T.A. SCHULTZ, P.K. WESTBIE, J.E. GERICH,and J.D. WALLIN:
Insulin-glucose dynamics during flow-through perfusion of the isolated rat hindlimb.
Horm. Metab.Res. 9 (1977), 190-195

537. DANIEL, P.M., E.R. LOVE,and O.E. PRATT:
Insulin-stimulated entry of glucose into muscle in vivo as a major factor in the regulation of blood glucose.
J. Physiol. 247 (1975), 273-288

538. KEUL, J., E.DOLL und D. KEPPLER:
Zum Stoffwechsel des Skeletmuskels. I. Glucose, Lactat, Pyruvat und freie Fettsäuren im arteriellen und venösen Blut der arbeitenden Muskulatur bei Hochleistungssportlern.
Pflüger's Arch. 301 (1968), 198-213

539. HERMANSEN, L., S. MAEHLUM, E.D.R. PRUETT, O. VAAGE, H. WALDUM,and T. WESSEL-AAS:
Lactate removal during exercise.
In "Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise"; ed. by H. HOWALD and J.R. POORTMANS.
Birkhäuser Verlag, Basel (1975), 101-105

540. ESSÉN, B., B. PERNOW, P.D. GOLLNICK,and B. SALTIN:
Muscle glycogen content and lactate uptake in exercising muscles.
In "Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise"; ed. by H. HOWALD and J.R. POORTMANS.
Birkhäuser Verlag, Basel (1975), 130-134

541. HERMANSEN, L., and O. VAAGE:
Lactate disappearance and glycogen synthesis in human muscle after maximal exercise.
Am.J.Physiol. 233 (1977), E422-E429

542. BROOKS, G.A., and G.A. GAESSER:
End points of lactate and glucose metabolism after exhausting exercise.
J. Appl.Physiol. 49 (1980), 1057-1069

543. WAHREN, J., P. FELIG, G. AHLBORG,and L. JORFELDT:
Glucose metabolism during leg exercise in man
J. Clin.Invest. 50 (1971), 2715-2725

544. ARVILL, A.:
Relationship between the effects of contraction and insulin on the metabolism of the isolated levator ani muscle of the rat.
Acta Endocrinol. 56, suppl. 122 (1967), 27-41

545. HOLLOSZY, J.O., and H.T. NARAHARA:
Studies of tissue permeability. X. Changes in permeability to 3-methylglucose associated with contraction of isolated frog muscle.
J.Biol.Chem. 240(1965), 3493-3500

546. STANDL, E., H.U. JANKA, T. DEXEL, and H.J. KOLB:
Muscle metabolism during rest and exercise: influence on the oxygen transport system of blood in normal and diabetic subjects.
Diabetes 25, suppl. 2 (1976), 914-919

547. HOLLOSZY, J.O., and F.W. BOOTH:
Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle.
Annu.Rev.Physiol. 38 (1976), 273-291

548. HOLLOSZY, J.O., F.W. BOOTH, W.W. WINDER, and R.H. FITTS:
Biochemical adaptation of skeletal muscle to prolonged physical exercise. In "Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise"; ed. by H. HOWALD and J.R. POORTMANS.
Birkhäuser Verlag, Basel (1975), 438-447

549. BERGER, M., F.W. KEMMER, K. BECKER, L. HERBERG, M. SCHWENEN, A. GJINAVCI, and P. BERCHTOLD:
Effect of physical training on glucose tolerance and on glucose metabolism of skeletal muscle in anaesthetized normal rats.
Diabetologia 16 (1979), 179-184

550. MONDON, C.E., C.B. DOLKAS, and G.M. REAVEN:
Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rats at rest.
Am.J.Physiol. 239 (1980), E 169 - E 177

551. BECKER-ZIMMERMANN, K., M. BERGER, P. BERCHTOLD, F.A. GRIES, L. HERBERG, and M. SCHWENEN:
Treadmill training improves glucose tolerance and insulin sensitivity in fatty ZUCKER rats.
Diabetologia, submitted for publication (1981)

552. BERGER, M., F.A. GRIES und N.B. RUDERMAN:
Einfluß der Muskelarbeit auf den Glucosestoffwechsel (in vitro). In "Muskelstoffwechsel, körperliche Leistungsfähigkeit und Diabetes mellitus"; hrsg. von K. JAHNKE, H. MEHNERT und H.E. REIS.
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York (1977), 99-107

553. BERCHTOLD, P., M. BERGER, W. WIEGELMANN, H. DROST, H.K. KLEY, H.J. CÜPPERS, U. SCHÄFER, F.A. GRIES und H. ZIMMERMANN:
Hormonelle Reaktionen unter Muskelarbeit.
ibid., S. 109-121

554. DIETERLE, P.:
Verhalten von Insulin unter körperlicher Arbeit.
ibid., S. 123-137

555. GOLDSTEIN, M.S.:
Muscular exercise and subsequent glucose utilization. In "On the Nature and Treatment of Diabetes"; ed. by B.S. LEIBEL and G.A. WRENSHALL.
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam (1965), 308-323

556. DIETZE, G., M. WICKLMAYR, I. BÖTTGER, R. SCHIFMANN, R. GEIGER, H. FRITZ,and H. MEHNERT:
The kallikrein-kinin system and muscle metabolism: biochemical aspects.
Agents Actions 10 (1980), 335-338

557. SCHULTZ, T.A., S.B. LEWIS, D.K. WESTBIE, J.E. GERICH, R.J. RUSHAKOFF,and J.D. WALLIN:
Glucose delivery - a clarification of its role in regulating glucose uptake in rat skeletal muscle.
Life Sci. 20 (1977), 733-735

558. SCHULTZ, T.A., S.B. LEWIS, D.K. WESTBIE, J.D. WALLIN,and J.E. GERICH:
Glucose delivery:a modulator of glucose uptake in contracting skeletal muscle.
Am.J.Physiol. 233 (1977), E 514-E 518

559. HOLLOSZY, J.O.,and H.T. NARAHARA:
Enhanced permeability to sugar associated with muscle contraction. Studies of the role of Ca^{++}.
J.Gen.Physiol. 50 (1967), 551-562

560. CLAUSEN, T.:
Calcium , glucose transport and insulin action. In "Biochemistry of Membrane Transport"; ed. by G. SEMENZA and E. CARAFOLI.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977), 481-499

561. MEYER, R.A., G.A. DUDLEY,and R.L. TERJUNG:
Ammonia and IMP in different skeletal muscle fibers after exercise in rats.
J.Appl.Physiol. 49 (1980), 1037-1041

562. MEYER, R.A.,and R.L. TERJUNG:
Differences in ammonia and adenylate metabolism in contracting fast and slow muscle.
Am.J.Physiol. 237 (1979), C 111-C 118

563. LOWENSTEIN, J.M.,and M.N. GOODMAN:
The purine nucleotide cycle in skeletal muscle.
Fed.Proc. 37 (1978), 2308-2312

564. DOHM, G.L., G.R. BEECHER, R.Q. WARREN,and R.T. WILLIAMS:
Influence of exercise on free amino acid concentrations in rat tissues.
J.Appl.Physiol. 50 (1981), 41-44

565. CHRISTOPHE, J., J. WINAND, R.KUTZNER,and M. HEBBELINCK:
Amino acid levels in plasma, liver, muscle, and kidney during and after exercise in fasted and fed rats.
Am.J.Physiol. 221 (1971), 453-457

566. BALDWIN, K.M., P.J. CAMPBELL,and D.A. COOKE:
Glycogen, lactate,and alanine changes in muscle fiber types during graded exercise.
J.Appl.Physiol. 43 (1977), 288-291

567. GOLDBERG, A.L.:
Influence of insulin and contractile activity on muscle size and protein balance.
Diabetes 28, Suppl. 1 (1979), 18-24

568. RENNIE, M.J., R.H.T. EDWARDS, C.T.M. DAVIES, S. KRYWAWYCH, D. HALLIDAY, J.C. WATERLOW, and D.J. MILLWARD:
Protein and amino acid turnover during and after exercise.
Biochem.Soc.Trans. 8 (1980), 499-501

569. POORTMANS, J.R.:
Effects of long lasting physical exercise and training on protein metabolism. In "Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise"; ed. by H. HOWALD and J.R. POORTMANS.
Birkhäuser Verlag, Basel (1975), 212-228

570. RENNIE, M.J., D.M. PARK, and W.R. SULAIMAN:
Uptake and release of hormones and metabolites by tissues of exercising leg in man.
Am.J.Physiol. 231 (1976), 967-973

571. LUYCKX, A.S., and P.J. LEFEBVRE:
Mechanisms involved in the exercise-induced increase in glucagon secretion in rats.
Diabetes 23 (1974), 81-93

572. FEDERSPIL, G., P. LEFEBVRE et A. LUYCKX:
Effects d'un exercise musculaire continu (nage forcée) sur la glycémie et le taux plasmatique des acides gras libres, de l'insuline et de la corticostérone chez le rat.
Arch.Int.Physiol.Biochim. 77 (1969), 778-786

573. BAXTER, J.D., and G.G. ROUSSEAU, eds.:
"Glucocorticoid Hormone Action".
Monographs on Endocrinology, Vol.12.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979)

574. SEITZ, H.J. und W. TARNOWSKI:
Nahrungsabhängige Regulation des Intermediärstoffwechsels.
In "Biochemie und Physiologie der Ernährung, Band I"; hrsg. von H.D. CREMER, D. HÖTZEL und J. KÜHNAU.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1980), 399-452

575. CARTER, W.J., K.M. SHAKIR, S. Hodges, F.H. FAAS, and J.O. WYNN:
Effect of thyroid hormone on metabolic adaptation to fasting.
Metabolism 24 (1975), 1177-1183

576. MÜLLER, M.J., and H.J. SEITZ:
Thyroid hormone action on gluconeogenesis in rat liver.
Acta Endocrinol., Suppl. 225 (1979), 17

577. PFEIFLE, B., R. PFEIFLE, J.D. FAULHABER, and H. DITSCHUNEIT:
Thyroid hormone stimulation of lipolysis and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in human adipose tissue.
Horm.Metab.Res. 12 (1980), 711-713

578. HUANG, M.T., and H.A. LARDY:
Effects of thyroid states on the Cori cycle, glucose-alanine cycle and futile cycling of glucose metabolism in rats.
Arch.Biochem.Biophys. 209 (1981), 41-51

579. GRANNER, D.K.:
The role of glucocorticoid hormones as biological amplifiers.
In "Glucocorticoid Hormone Action"; ed. by J.D. BAXTER and G.G. ROUSSEAU.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 593-611

580. ROUSSEAU, G.G., and J.D. BAXTER:
Glucocorticoids and the metabolic code.
ibid., 613-629

581. MARUYAMA, K., and S. EBASHI:
Regulatory proteins of muscle.
In "The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food, 2"; ed. by E.J. BRISKEY, R.G. CASSENS and B.B. MARSH.
The University of Wisconsin Press, Madison, Milwaukee, London (1970), pp. 373-381

582. GARBER, A.J., P.E. CRYER, J.V. SANTIAGO, M.W. HAYMOND, A.S. PAGLIARA, and D.M. KIPNIS:
The role of adrenergic mechanisms in the substrate and hormonal response to insulin-induced hypoglycemia in man.
J.Clin.Invest. 58 (1976), 7-15

583. CHOWERS, I., R. EINAT, and S. FELDMAN:
Effects of starvation on levels of corticotrophin releasing factor, corticotrophin and plasma corticosterone in rats.
Acta Endocrinol. 61 (1969), 687-694

584. GARBER, A.J., I.E. KARL, and D.M. KIPNIS:
Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal musle. IV. β-adrenergic inhibition of amino acid release.
J.Biol.Chem. 251 (1976), 851-857

585. LI, J.B., and L.S. JEFFERSON:
Effect of isoproterenol on amino acid levels and protein turnover in skeletal muscle.
Am.J.Physiol. 232 (1977), E 243 - E 249

586. MAHLER, R.J., O. SZABO, and J.C. PENHOS:
Antagonism to insulin action on the perfused hind limb of the rat by a reduced insulin B chain-albumin complex.
Diabetes 17 (1968), 1-7

587. BASS, A.D., J.W. CHAMBERS, and A.A. RICHTARIK:
The effect of hydrocortisone on AIB uptake by the isolated perfused rat liver.
Life Sci. 4 (1963), 266-269

588. BERNT, E. und H.U. BERGMEYER:
L-Glutamat. UV-Test mit Glutamat-Dehydrogenase und NAD.
In "Methoden der enzymatischen Analyse"-Band II, 3. Auflage;
hrsg. von H.U. BERGMEYER.
Verlag Chemie, Weinheim (1974), SS. 1749-1753

589. LUND, P.:
L-Glutamin. Bestimmung mit Glutaminase und Glutamat-Dehydrogenase.
ibid.,SS. 1767-1769

590. LANG, G. und G. MICHAL:
D-Glucose-6-phosphat und D-Fructose-6-phosphat.
ibid., SS. 1283-1287

591. DAGLEY, S.:
Citrat. UV.-Spektrophotometrische Bestimmung.
ibid., SS. 1607-1611

592. PILKIS, S.J.:
Hormonal control of hexokinase activity in animal tissues.
Biochim.Biophys.Acta 215 (1970), 461-476

593. SPACKMAN, D.A., W.H. STEIN,and S. MOORE:
Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.
Anal.Chem. 30 (1958), 1190-1206

594. ARMSTRONG, M.D.,and U. STAVE:
A study of plasma free amino acid levels. I. Study of factors affecting validity of amino acid analyses.
Metabolism 22 (1973), 549-560

595. Biotronik:
Aminosäurenanalysator- Chromatographiesystem LC 6000.
Firmenschrift, München (1975)

596. KATZ, J., S. GOLDEN,and P.A. WALS:
Stimulation of hepatic glycogen synthesis by amino acids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976), 3433-3437

597. BLACKSHEAR, P.J., P.A.H. HOLLOWAY,and K.G.M.M. ALBERTI:
The effects of starvation and insulin on the release of gluconeogenic substrates from the extra-splanchnic tissues in vivo.
FEBS Lett. 48 (1974), 310-313

598. FEHLMANN,M.,A.Le CAM, P. KITABGI, J.F. REY,and P. FREYCHET:
Regulation of amino acid transport in the liver.Emergence of a high affinity transport system in isolated hepatocytes from fasting rats.
J.Biol.Chem. 254 (1979), 401-407

599. PEÑA, A. B. DVORKIN, and A. WHITE:
Acute effect of a single in vivo injection of cortisol on in vitro amino acid incorporating activity of rat liver and thymic preparations.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 16 (1964), 449-454

600. ASHMORE, J.:
The role of adrenal steroids in the regulation of hepatic metabolism. In "Metabolic Effects of Adrenal Hormones"; ed. by G.E.W. WOLSTENHOLME and M. O'CONNOR.
J.&.A. Churchill Ltd., London (1960), 25-34

601. SCHUTZ, G., L. KILLEWICH, G. CHEN, and P. FEIGELSON:
Control of the mRNA for hepatic tryptophan oxygenase during hormonal and substrate induction.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72 (1975), 1017-1020

602. DANIEL, P.M., O.E. PRATT, and E. SPARGO:
The metabolic homoeostatic role of muscle and its function as a store of protein.
Lancet II, August 27 (1977), 446-448

603. REICHSBERG, S.B., and T.D. GELEHRTER:
Glucocorticoid inhibition of two discrete glycine transport systems in rat hepatoma cells.
J.Biol.Chem. 255 (1980), 5708-5714

604. SCHIMKE, R.T.:
Regulation of protein degradation in mammalian tissues. In "Mammalian Protein Metabolism, Vol.IV"; ed. by H.N. MUNRO.
Academic Press, New York, London (1970), 177-228

605. GELEHRTER, T.D.:
Enzyme induction.
New Engl.J.Med. 294 (1976), 522-526 (part 1)
589-595 (part 2), 646-651 (part 3)

606. JOHNSON, L.K., J.D. BAXTER, and G.G. ROUSSEAU:
Mechanisms of glucocorticoid receptor function. In "Glucocorticoid Hormone Action"; ed. by J.D. BAXTER and G.G. ROUSSEAU.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 305-326

607. STEINBERG, R.A., and R.D. IVARIE:
Posttranscriptional regulation of glucocorticoid-regulated functions.
ibid., 291-304

608. ARVILL, A., and K. AHRÉN:
Effects of insulin on the intact levator ani muscle of the rat.
I. Effects on the accumulation of α-aminoisobutyric acid and D-xylose.
Acta Endocrinol. 56 (1967), 279-294
II. Relationship between the effects on amino acid transport, RNA synthesis and protein synthesis
ibid., 295-307

609. PAGLIARA, A.S., I.E. KARL, D.C. De VIVO, R.D. FEIGIN, and D.M. KIPNIS:
Hypoalaninemia:a concomitant of ketotic hypoglycemia.
J.Clin.Invest. 51 (1972), 1440

610. De BODO, R.C., and N. ALTSZULER:
Insulin hypersensitivity and physiological insulin antagonists.
Physiol.Rev. 38 (1958), 389-445

611. CONN, J.C., and S.S. FAJANS:
Influence of adrenal cortical steroids on carbohydrate metabolism in man.
Metabolism 5 (1956), 114-127

612. GUIDOTTI, G.G., R. FRANCHI-GAZZOLA, G.C. GAZZOLA, and P. RONCHI:
Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells.
IV. Site and mechanism of insulin action.
Biochim.Biophys.Acta 356 (1974), 219-230

613. PERLEY, M., and D.M. KIPNIS:
Effect of glucocorticoids on plasma insulin.
New Engl.J.Med. 274 (1966), 1237-1241

614. BROOKS, G.A., K.E. BRAUNER, and R.G. CASSENS:
Glycogen synthesis and metabolism of lactic acid after exercise.
Am.J.Physiol. 224 (1973), 1162-1166

615. LOWENSTEIN, J.M.:
Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle.
Physiol.Rev. 52 (1972), 382-414

616. STALMANS, W., and M. LALOUX:
Glucocorticoids andhepatic glycogen metabolism.
In "Glucocorticoid Hormone Action";
ed. by J.D. BAXTER and G.G. ROUSSEAU.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 517-533

617. ÁCS, Z., E. STARK, and G. FOLLY:
Steroid-binding properties of corticosteroid receptors in different target tissues of the rat.
J.Steroid Biochem. 6 (1975), 1127-1130

618. SHOJI, S., and R.J.T. PENNINGTON:
Binding of dexamethasone and cortisol to cytosol receptors in rat extensor digitorum longus and soleus muscles.
Exp.Neurol. 57 (1977), 342-348

619. FAIN, J.N.:
Inhibition of glucose transport in fat cells and activation of lipolysis by glucocorticoids.
In "Glucocorticoid Hormone Action";
ed. by J.D. BAXTER and G.G. ROUSSEAU.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 547-560

620. La NOUE, K.F., and A.C. SCHOOLWERTH:
Metabolite transport in mitochondria.
Annu.Rev.Biochem. 48 (1979), 871-922

621. CZECH, M.P., and J.N FAIN:
Antagonism of insulin action on glucose metabolism in white fat cells by dexamethasone.
Endocrinology 91 (1972), 518-522

622. OLEFSKY, J.M.:
Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes.
J.Clin.Invest. 56 (1975), 1499-1508

623. ROSEN, J.M., R.J. MILHOLLAND, and F. ROSEN:
A comparison of the effect of glucocorticoids on glucose uptake and hexokinase activity in lymphosarcoma P 1798.
Biochim.Biophys.Acta 219 (1970), 447-454

624. ZYSKOWSKI, L., and A. MUNCK:
Interactions of cortisol and anoxia on hexose transport in rat thymocytes.
Fed.Proc. 34 (1975), 329

625. MATSUI, N., and J.E. PLAGER:
"Anti-insulin" action of cortisol.
1. Influence of cortisol on the metabolism of specifically labeled glucose, pyruvate and glucose-6-phosphate.
Endocrinology 84 (1969), 1439-1449

626. ARIYOSHI, Y.,J. PLAGER, and N. MATSUI:
The influence of cortisol on 2-deoxyglucose penetration and phosphorylation by the mouse ear strip preparation.
Acta Endocrinol. 74 (1973), 723-731

627. CZECH, M.P., and J.N. FAIN:
Dactinomycin inhibition of dexamethasone action on glucose metabolism in white fat cells.
Biochim.Biophys.Acta 230 (1971), 185-193

628. WATFORD, M., P. LUND, and H.A. KREBS:
Isolation and metabolic characteristics of rat and chicken enterocytes.
Biochem.J. 178 (1979), 589-596

629. FÖRSTER, M.E.C., P. SCHADEWALDT, and W. STAIB:
In vitro and in situ skeletal muscle pyruvate dehydrogenase activity in adrenalectomized and glucocorticoid treated rats.
Regard sur la biochimie, No. 3 (1981), 69

630. ELSAS,II, L.J., R.C. Mac DONELL, jr., and L.E. ROSENBERG:
Influence of age on insulin stimulation of amino acid uptake in rat diaphragm.
J.Biol.Chem. 246 (1971), 6452-6459

631. BAXTER, J.D., and G.G. ROUSSEAU:
Glucocorticoid hormone action: an overview.
In "Glucocorticoid Hormone Action";
ed. by J.D. BAXTER and G.G. ROUSSEAU.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 1-24

632. NICKOL, J.M., K.L. LEE, and F.T. KENNEY:
Changes in hepatic levels of tyrosine aminotransferase messenger RNA during induction by hydrocortisone.
J.Biol.Chem. 253 (1978), 4009-4015

633. SCHUTZ, G., L. KILLEWICH, G. CHEN, and P. FEIGELSON:
Control of the mRNA for hepatic tryptophan oxygenase during hormonal and substrate induction.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72 (1975), 1017-1020

634. VIGNOS, P.J.,jr., and R. GREENE:
Oxidative respiration of skeletal muscle in experimental corticosteroid myopathy.
J.Lab.Clin.Med. 81 (1973), 365-378

635. KOSKI, C.L., D.H. RIFENBERICK, and S.R. MAX:
Oxidative metabolism of skeletal muscle in steroid atrophy.
Arch.Neurol. 31 (1974), 407-410

636. YOUNG, D.A.:
Glucocorticoid action on rat thymus cells.
Interrelationships between carbohydrate, protein, and adenine nucleotide metabolism and cortisol effects on these functions in vitro.
J.Biol.Chem. 244 (1969), 2210-2217

637. YOUNG, D.A.:
Glucocorticoid action on rat thymus cells.
II. Interrelationships between ribonucleic acid and protein metabolism and between cortisol and substrate effects on these metabolic parameters in vitro.
J.Biol.Chem. 245 (1970), 2747-2752

638. ROSEN, J.M., J.J. FINA, R.J. MILHOLLAND, and F. ROSEN:
Inhibition of glucose uptake in lymphosarcoma P 1798 by cortisol and its relationship to the biosynthesis of deoxyribonucleic acid.
J.Biol.Chem. 245 (1970), 2074-2080

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof.Dr.med.W.Staib, für die Zeit danken, die ich bisher mit ihm zusammenarbeiten durfte. Herr Prof.Staib führte mich bereits im Rahmen meiner Dissertation in die Methodik der isolierten Organperfusion ein und weckte mein Interesse an Fragen der hormonellen Stoffwechselregulation. Seine Anregungen, sachliche Kritik und Diskussionsbereitschaft und sein menschliches Verständnis und Entgegenkommen bedeuteten mir immer eine große Hilfe.
Für die hervorragende technische Assistenz und qualifizierte Zusammenarbeit möchte ich Frau G.Hannemann und Frau M.Prengel besonders herzlich danken. Ihre unermüdliche Einsatzbereitschaft trug wesentlich zum Gelingen der Untersuchungen bei.
Für die wertvolle Mitarbeit bei Teilaspekten der Arbeit danke ich Frau F.Skov, Herrn Dr.med.N.Kühn-Velten, Herrn P.Thomaßen, Herrn Dr.med.W.Staschok, Herrn Dr.med.S.Bruski, Frau B.Grunenberg, Frau Dr.med.G.Magrian, Herrn P.Heinzler, Herrn H.J.Coone, Herrn C.Cassier und Herrn T.Wagner. Herrn Dr.rer. nat.P.Schadewaldt bin ich für die kollegiale und engagierte Zusammenarbeit zu besonderem Dank verpflichtet.
Für die Anfertigung von Teilen des Perfusionssystems und die Herstellung des Laufbandes für Trainingsuntersuchungen möchte ich Herrn Feinmechanikermeister B.Kump, für die Ausführung der fotografischen Arbeiten Frau I.Wegling sehr herzlich danken.
Nicht zuletzt gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die meine Untersuchungen seit 1974 in großzügiger Weise finanziell unterstützte und ermöglichte (Projekt A III 7 und G 3 "Insulinantagonisten beim diabetischen Stoffwechselsyndrom" im Sonderforschungsbereich 113 - Diabetesforschung Düsseldorf). Den Kolleginnen und Kollegen im Sonderforschungsbereich bin ich für zahlreiche Anregungen und Diskussionen, besonders im Rahmen des Arbeitskreises "Muskelstoffwechsel", dankbar.